



**LILIANA
PATRÍCIA
SILVA VIEIRA**

**A CITOLOGIA E A PESQUISA DE DNA NO
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV**



**LILIANA
PATRÍCIA
SILVA VIEIRA**

**A CITOLOGIA E A PESQUISA DE DNA NO
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento de requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o Júri

presidente

Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de
Biologia da Universidade de Aveiro

orientadora

Professora Doutora Adelaide Almeida
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro

arguente convidado

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira
Investigadora em Pós-Doutoramento do Centro de Estudos
do Ambiente e do Mar (CESAM)

agradecimentos

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese de Mestrado:

À Professora Doutora Adelaide Almeida por ter aceitado tão prontamente ser minha orientadora e pela ajuda e apoio com que me presenteou durante esta caminhada, percebendo as minhas limitações e ajudando-me sempre a ultrapassá-las.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira pela total disponibilidade e ajuda na fase inicial do mestrado, incluindo na escolha do tema da tese, no esclarecimento de todas as dúvidas e na atribuição de um(a) orientador(a).

Ao Dr. Jorge Pereira, gerente da Microdiag – Laboratório de Anatomia Patológica, Lda., e a todos os seus funcionários pela disponibilidade imediata em me ajudar e em ceder os resultados do laboratório, imprescindíveis para a realização deste trabalho, e pela simpatia, paciência e boa disposição com que me receberam sempre na “sua casa”.

À Dra. Beatriz Godinho e à Dra. Maria Beatriz Tomaz, membros da administração do Grupo Beatriz Godinho, pela disponibilidade imediata em me ajudar e ceder os resultados da secção de Biologia Molecular, bem como o fornecimento das bulas referentes ao método molecular usado neste estudo. A todos os meus colegas do Grupo Beatriz Godinho que me ajudaram, nomeadamente, a Adélia Moderno e a Raquel Costa pela ajuda prestada inerente à secção de Biologia Molecular, a Cristina Miguel pela paciência com que orientou os horários que me permitiram realizar este trabalho, a Joana Pragosa que tanta vez perdeu as suas folgas para me substituir no meu local de trabalho sempre que precisei de faltar, o Dr. Alfredo Rodrigues que foi quem me pôs em contacto com o Dr. Jorge Pereira da Microdiag, a Célia Santos pelas ajudas técnicas e informáticas, a Tânia Rodrigues pela paciência com que ouviu os meus desabaços e pelo apoio que sempre me deu, e a todos que se preocuparam e me apoiaram.

Ao Dr. Hugo Prazeres, membro da direcção da Infogene, pela disponibilidade e simpatia com que me atendeu e cedeu a bula referente ao método molecular usado nesta instituição.

À minha família e aos meus amigos por terem acreditado nas minhas capacidades e pelo apoio que sempre me deram.

palavras-chave

Vírus do Papiloma Humano, Cancro do Cóló do útero, citologia, biopsia, PapilloCheck® Test Kit

resumo

A infecção por Papilomavírus Humano (HPV) é a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo. A presença do DNA do HPV foi verificada em quase 100% dos epitélios dos carcinomas invasivos, levando à tese mundialmente aceite de que a infecção pelo vírus HPV é causa necessária para o desenvolvimento do cancro do cólo do útero. Este estudo teve como principal objetivo fazer uma comparação entre os resultados obtidos pela técnica citológica e pela pesquisa do DNA viral do HPV e respetiva genotipagem, no âmbito do rastreio do cancro do cólo do útero. Adicionalmente foram considerados os resultados obtidos pelas biopsias realizadas em algumas das amostras. Assim foram recolhidos e comparados os resultados da pesquisa do DNA viral do HPV pelo método PapilloCheck® Test Kit com os resultados da técnica citológica em 994 amostras, e os resultados da técnica histológica em 28 destas amostras. De todas as amostras cerca de 28% apresentaram HPV positivo, sendo que destas 90% são infeções por HPV de alto/provável alto risco. A maioria das alterações citológicas apareceram em amostras com HPV positivo e, dentro destas, as lesões mais graves surgiram, na sua maioria, em amostras com infeção múltipla. Os resultados obtidos indicam que, de forma geral, existe concordância entre a deteção do DNA do HPV e a citologia. No entanto, cerca de 27% das amostras com HPV positivo apresentaram citologias normais, e em cerca de 2% das amostras com lesões intraepiteliais não foi detetado o DNA do vírus. Estes casos levantam dúvidas no momento da sua interpretação e na decisão sobre se deverá proceder ou não a tratamento. Juntando este facto às limitações que ambos os métodos de diagnóstico apresentam, é possível concluir que nenhuma das técnicas é suficiente por si só, devendo recorrer-se aos dois métodos de forma conjunta para que se possam complementar um ao outro. Ambos os métodos são importantes quer numa perspetiva de prevenção, através de programas de rastreio, quer no seguimento de casos já identificados, permitindo reduzir o número de casos de cancro do cólo do útero.

keywords

Human Papillomavirus, cervical cancer, cytology, biopsy, PapilloCheck® Test Kit

abstract

Human Papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection in the world. The presence of HPV DNA was detected in nearly 100% of invasive carcinomas of epithelia, leading to worldwide accepted thesis that the HPV virus infection is necessary to cause the development of cervical cancer. The aim of this study was to make a comparison between the results obtained by cytologies and by the detection of HPV DNA and its genotyping, in the screening of cervical cancer. Additionally were considered the results achieved by biopsies performed in some of the samples. The results of the PapilloCheck ® Test Kit and the results of cytologies in the 994 samples, and the results of 28 biopsies were compared. From all the samples in about 28% was detected HPV infection. In all of these positive results, about 90% were high risk infections. The most of the cytology lesions appeared in HPV positive samples, and within these, the most serious injuries occurred, mostly in samples with multiple HPV infections. The results indicate that, in general, there is correlation between the detection of HPV DNA and cytology. However, about 27% of HPV positive samples had normal cytology, and in about 2% of the samples with intraepithelial lesions HPV was not detected. These cases raise questions about their interpretation and about the decision to proceed or not with treatment. Joining this fact to the limitations of both methods of diagnosis, it is possible to conclude that none of the techniques is enough by itself, and should be applied together so that they can complement one another. The two methods are important both for prevention, through screening programs, both in the follow-up to cases already identified, allowing to reduce the number of cervical cancer cases.

Abreviaturas

ASC-H - células escamosas atípicas não se excluindo lesão intraepitelial de alto grau (ACS-H)

AS-CUS – células escamosas atípicas de significado indeterminado

CIN – neoplasia cervical intraepitelial

DIU – Dispositivo Intra-uterino

DNA ou ADN – Ácido desoxirribonucleico

DST – doenças sexualmente transmissíveis

EGF – fator de crescimento epidérmico

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Papilomavírus Humano

HSIL – lesões intraepiteliais escamosas de alto grau

IFN - *Interferon*

LCR – *Long Control Region*

LEEP – *Loop electrosurgical excision procedure*

LSIL – lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau

ORF – *Open Reading Frames*

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDT – terapia fotodinâmica

RNA ou ARN – Ácido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

SIL – lesões intraepiteliais escamosas

VIA – *Visual Inspection with Acetic Acid*

VILI – *Visual Inspection with Lugol's Iodine*

VLPs – *Viral like particles*

Índice de figuras

Fig.1: Genoma HPV	13
Fig.2: Secção de tecido de um papiloma da laringe, corado pelo método hematoxilina-eosina	17
Fig.3: Carcinogénese do colo do útero	19
Fig.4: Prevalência dos vários tipos de HPV nas várias regiões do mundo	20
Fig. 5: Exemplo de terapias convencionais para as lesões cervicais cancerosas e não-cancerosas	40
Fig. 6: Tipos de HPV detetados pelo PapilloCheck® Test Kit	56
Fig. 7: Princípio resumido do PapilloCheck® Test Kit	57
Fig. 8: <i>Layout</i> de um chip	58
Fig. 9: Chip após ter sido submetido à excitação a 532 nm (verde) e a 635 nm (vermelho)	59
Fig. 10: Esquema dos passos efectuados na Hibridação e Lavagem do chip	63
Fig.11: Demonstração dos resultados	64
Fig.12: HPV positivo por faixa etária.....	65
Fig. 13 - Resultados da pesquisa do DNA viral do HPV.....	66
Fig. 14 - Tipos de vírus detetados nas amostras positivas para o HPV, quanto ao risco.....	67

Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação de alguns HPV quanto ao risco oncogénico e natureza das lesões virais mais frequentemente associadas	13
Tabela 2 – Adequação da amostra - Sistema de Bethesda	32
Tabela 3 – Interpretação dos resultados - Sistema de Bethesda	32
Tabela 4 – Passos a efetuar para a extração do DNA	59
Tabela 5 – Componentes necessários à reação de PCR.....	61
Tabela 6 – Programa do termociclador do PapilloCheck® Test Kit.....	61
Tabela 7 – Passos da hibridação e lavagem.....	62
Tabela 8 – Intervalo das idades	65
Tabela 9 – HPV positivo por faixa etária	65
Tabela 10 – Resultados da pesquisa do DNA viral do HPV	66
Tabela 11 – Tipos de vírus detetados nas amostras positivas para o HPV, quanto ao risco.....	67
Tabela 12 – HPV de alto risco/provável alto risco detetados nas amostras positivas para o HPV	67
Tabela 13 – HPV de baixo risco detetados nas amostras positivas para o HPV..	68
Tabela 14 – Resultado das citologias das amostras com resultado negativo e positivo para o HPV.....	68
Tabela 15 – Resultado das citologias das amostras com HPV positivo de acordo com o tipo de risco e com a existência ou não de infeções múltiplas.....	69
Tabela 16 – Resultado das biópsias das amostras com resultado negativo e positivo para o HPV.....	69
Tabela 17 – Resultados das repetições efetuadas em amostras diferentes de 15 utentes	70

Índice

Capítulo I - Introdução	12
1. Papilomavírus Humano (HPV)	12
1.1 Estrutura e classificação	12
1.2 Genoma	13
1.3 Proteínas virais e suas funções	14
1.4 Replicação Viral	16
1.5 Prevalência	19
2. Doenças associadas à infecção por HPV	20
2.1 Lesões tumorais	21
2.1.1 Cancro do cólo do útero	21
2.1.2 Cancro da vagina	23
2.1.3 Cancro da vulva	23
2.1.4 Cancro do ânus	23
2.1.5 Cancro do pênis	23
2.1.6 Cancro do ovário	24
2.1.7 Cancro oral	24
2.1.8 Outros cancros	24
2.2 Lesões não tumorais	24
2.2.1 Verrugas genitais	25
2.2.2 Verrugas nas mãos e nos pés	25
2.2.3 Papilomatose respiratória recorrente	25
3. Resposta imunitária do hospedeiro	26
4. Transmissão	27
4.1 Transmissão por via sexual	27
4.2 Transmissão por via vertical – mãe/filho	28
4.3 Outras formas de transmissão	29
5. Fatores de risco	29
5.1 Comportamentos sexuais	29
5.2 Tabaco e álcool	29
5.3 Uso de contraceptivos orais	30
5.4 Outras infeções sexualmente transmissíveis	30
6. Diagnóstico	30
6.1 Citologia/ Teste de Papanicolau	31
6.2 Colposcopia	33
6.3 Testes serológicos	33
6.4 Testes moleculares	34
6.4.1 Amplificação de sinal	35
6.4.2 Amplificação - alvo	36
6.4.3 Técnicas baseadas em Microarrays	38
7. Tratamento	40

7.1 Terapias em uso	40
7.1.1 Terapias convencionais	40
7.1.2 Terapias alternativas	42
7.2 Novas terapias	43
7.2.1 Vacinas terapêuticas	44
7.2.2 Terapias baseadas na interferência ao RNA	44
7.2.3 Terapias com recurso a derivados de ervas e outros produtos naturais	45
7.3 Terapias usadas em Portugal.....	45
8. Prevenção	46
8.1 Evitar comportamentos de risco	46
8.2 Programas de rastreio	46
8.3 Vacinação.....	50
Capítulo II - Objetivos	54
Capítulo III – Material e Métodos	55
1. Amostras.....	55
2. Métodos	55
2.1 Técnica citológica com recurso ao sistema automatizado Thin-Prep	55
2.2 Técnica histológica	56
2.3 Pesquisa do DNA do HPV pelo método PapilloCheck® Test Kit	56
2.3.1 Extração do DNA	59
2.3.2 Preparação da Uracil-N-DNA-Glicosilase	61
2.3.3 PCR	61
2.3.4 Hibridização e lavagem	62
2.3.5 Leitura do chip e análise dos resultados	63
Capítulo IV – Resultados	65
Capítulo V – Discussão.....	71
Capítulo VI – Considerações Finais.....	78
Capítulo VII – Referências Bibliográficas.....	80

Capítulo I – Introdução

1. Papilomavírus Humano (HPV)

Os papilomavírus são vírus da família *Papovaviridae*, que se divide em duas subfamílias, cada uma com um único género: *Papilomavirinae* (género *Papilomavirus*) e *Poliomavirinae* (género *Poliomavirus*).⁽³²⁾

A natureza viral das lesões foi comprovada pela primeira vez em 1907. Foi demonstrada a sua transmissão através dos extratos celulares de papilomas. O vírus foi isolado por Shope em 1933.⁽³²⁾

1.1 Estrutura e Classificação

Estes vírus possuem uma dupla cadeia de DNA circular com aproximadamente 8 mil pares de bases. A cápside é icosaédrica, com cerca de 72 capsómeros, tem um diâmetro de 50 a 60 nm, e não é revestido por invólucro lipídico.^(30,32,40,88)

Já foram quantificados mais de 200 tipos de HPV, no entanto, só cerca de 100 foram já identificados e sequenciados. Cada tipo está associado a manifestações clínicas específicas.^(30,32,88) Os vários tipos de vírus distinguem-se uns dos outros através do grau de homologia entre a sequência de ácidos nucleicos.^(30,32,88)

Existem dois tipos de classificação. Uma delas está relacionada com o tropismo do vírus pelo tipo de epitélio infetado, dividindo os vírus em cutaneotrópicos, quando infetam a epiderme, e mucosotrópicos quando infetam todo o tipo de mucosas em geral.^(88,97) O outro tipo de classificação divide os vírus em duas categorias principais de risco relativamente ao desenvolvimento de neoplasias, vírus de baixo risco e vírus de alto risco (Tabela 1). Os primeiros estão associados a lesões benignas e os segundos associam-se a lesões nas mucosas que podem tornar-se malignas.^(88,97)

Tabela 1 – Classificação de alguns HPV quanto ao risco oncogénico e natureza das lesões virais mais frequentemente associadas. ⁽⁹⁷⁾

Classificação	Tipo Viral	Lesão
Baixo Risco	6, 11, 42, 43, 44, 54,	Benigna
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68	Maligna

1.2 Genoma

A organização genómica (Fig.1) é similar em todos os papilomavírus e consiste em 2 regiões: uma região codificante com cerca de 8/9 Open Reading Frames (ORF) que contém os genes precoces, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, com informação necessária para codificar as proteínas responsáveis pela replicação viral e transcrição, e os genes tardios, L1 e L2, que codificam as proteínas da cápside; e uma região não codificante, designada por Long Control Region (LCR), que se localiza entre os ORF L1 e E6 e contém a grande maioria dos elementos reguladores envolvidos na replicação e transcrição do DNA viral. ^(30,32,40,58,87,88)

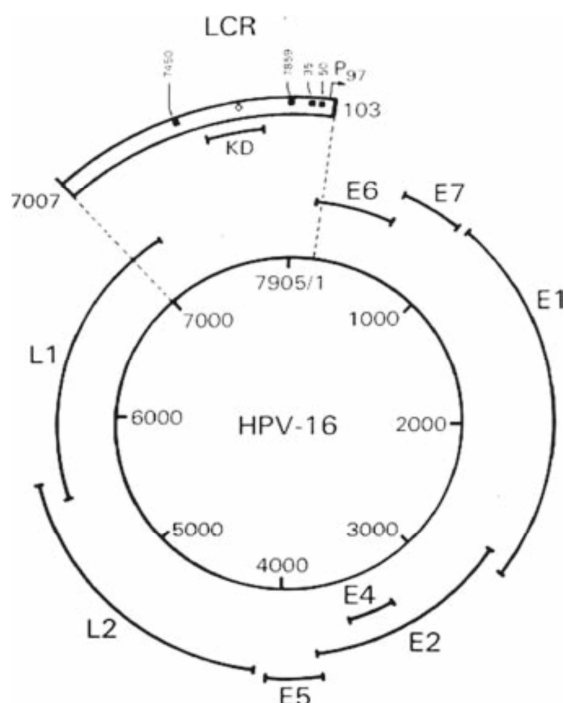


Fig.1 - Genoma HPV.

A dupla cadeia é representada por um círculo negro com os nucleótidos numerados. Estão apresentadas também as várias regiões que compõem o genoma. ⁽⁴⁰⁾

1.3 Proteínas virais e suas funções

A proteína E1 funciona como um iniciador, liga-se especificamente ao local de origem da replicação viral (que se encontra na região LCR, entre os nucleótidos 7911 e 7927), desenrola a cadeia de DNA e interage com proteínas da célula hospedeira. A proteína viral E2 funciona como um fator de replicação acessório, formando um complexo com a proteína E1 aumentando assim a interação desta com a célula hospedeira. ^(54,90,94,104) A proteína E2 poderá ainda, segundo alguns estudos, regular a replicação do papilomavírus através da sua capacidade de modular a expressão viral do gene. Pensa-se que esta replicação poderá acontecer através da ação de proteínas E2 truncadas, chamadas de E2 repressoras, cujo papel na replicação viral não foi ainda determinado. ^(54,90,94,104) São estas duas proteínas que dão, assim, início à infecção viral, e atuam durante a fase S do ciclo celular. Formam um complexo importante no início da replicação, uma vez que uma sem a outra não consegue produzir os mesmos efeitos. Vários estudos indicam que a proteína E2 reforça, em quantidade e qualidade, a ligação da proteína E1 ao local de origem da replicação. ^(54,90,94,104)

O ORF4 localiza-se na região precoce E e codifica a proteína E4, mas o seu gene é expresso de forma tardia. O mRNA é formado por splicing a partir do ORF1 até um local do ORF4, codificando uma proteína com alguns codões da E1 e os restantes da E4, designando-se, por isso, como proteína E1'E4. ^(19,90) Esta proteína é sequencialmente muito diferente e a mais abundante entre os vários tipos de vírus e tem como função induzir o colapso da rede de citoqueratina, auxiliando a libertação do vírus na célula hospedeira. ^(19,90)

A E5 é uma proteína pequena e multi-funcional predominantemente localizada no retículo endoplasmático. Interage com uma ATPase vacuolar e, por meio de um sinal da via de transdução dos recetores de fator de crescimento, a proteína E5 parece atuar, sinergicamente, com o fator de crescimento epidérmico, EGF (*epidermal growth factor*), modulando o crescimento celular. ^(13,14,19) Assim esta proteína pode ter um papel importante na proliferação das células infetadas durante a fase de reparação do tecido que ocorre após uma ferida, ou seja, quando o vírus inicialmente entra no organismo. ^(13,14,19) Pensa-se que a proteína

E5 promova a eficácia das oncoproteínas E6 e E7, podendo também estar relacionada com a regulação da resposta imune ao vírus. ^(13,14,19)

Vários estudos demonstraram que os genes precoces são transcritos a partir de promotores, por *splicing* diferencial. Assim, vários mRNA são produzidos a partir de promotores diferentes. ^(11,13,29) As proteínas traduzidas a partir desses mRNA vão interferir na função de proteínas celulares que controlam o ciclo normal da célula, a diferenciação celular e a apoptose. ^(11,13,29) As oncoproteínas E6 e E7 atuam, em conjunto, na indução e manutenção do fenótipo transformado, regulando o ciclo viral na célula. Estas oncoproteínas associam-se a fatores supressores de tumor; E6 associa-se a níveis celulares de p53 e E7 relaciona-se com a proteína retinoblastoma (pRb). ^(11,13,29)

A proteína E6 é uma proteína pequena com apenas 151 aminoácidos. A sua principal função é degradar a proteína p53, cuja função é regular o ciclo celular ao impedir ou atrasar a replicação da célula aquando a presença de danos no DNA, assegurando a integridade do genoma celular. ^(11,13,14,40,97) Com a sua função diminuída há um descontrolo desta regulação, aumentando a proliferação, reduzindo a apoptose de células danificadas e a reparação do DNA. ^(11,13,14,40,97) Em consequência, há um aumento da frequência das mutações, dos rearranjos cromossómicos e das aneuploidias, podendo potenciar o desenvolvimento de ocorrências cancerígenas. A degradação do p53 parece ocorrer em maior escala nos vírus HPV de alto risco. ^(11,13,14,40,97)

A proteína E7 parece ser, de entre as proteínas precoces, a mais eficiente na desregulação do ciclo celular. ^(11,14,40,97) É uma proteína com 98 aminoácidos e está associada à inativação das proteínas da família pRb. Estas proteínas inibem a progressão do ciclo celular, pois é capaz de sequestrar o fator de transcrição E2F e impedi-lo de promover a transcrição de genes necessários para a replicação do DNA na fase S, exercendo, assim, uma regulação negativa do ciclo celular. ^(11,14,40,97) A associação da proteína pRb com a proteína viral E7 causará uma perturbação no controle normal do ciclo celular, resultando num estímulo excessivo para a proliferação das células infetadas. ^(11,14,40,97) A perda combinada de p53 e da função de Rb parece agir sinergicamente para a formação de um processo maligno. ^(11,14,40,97)

As proteínas codificadas pelos genes tardios, L1 e L2, são componentes estruturais do capsídeo viral. Cinco proteínas L1 juntas formam um pentâmero, sendo que, 72 destes pentâmeros formam a partícula viral (responsável pela resposta humoral e formação de anticorpo).^(11,19,29,87) A expressão destas duas classes de proteínas é altamente regulada e estão associadas à diferenciação de células epiteliais infectadas pelo HPV, ocorrendo nas camadas superiores do tecido infectado. As proteínas L1 e L2, depois de sintetizadas no citoplasma, são direcionadas para o núcleo da célula, onde ocorre a montagem das novas partículas, nas camadas mais superficiais do epitélio.^(11,19,29,87) A proteína L2 não é essencial para a formação do capsídeo *in vitro*, no entanto, vários estudos sugerem que esta proteína tem um papel importante no empacotamento do DNA viral ou na montagem da partícula viral, uma vez que a formação do capsídeo aumenta 100 vezes na presença de L2 *in vitro*.^(11,19,29,87) Estas duas proteínas parecem trabalhar em conjunto, de modo a que enquanto a L1 forma os capsómeros, a L2 ajuda a manter a forma e a estabilidade destes. A libertação das partículas virais ocorre na superfície da lesão, durante a descamação celular.^(11,19,29,87)

1.4 Replicação viral

Os papilomavírus são espécie-específicos e têm tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas.⁽¹³⁾

O HPV infecta células epiteliais das mucosas e cutâneas do tecido epitelial pavimentoso estratificado e produz viriões ao mesmo tempo que estas células se diferenciam (Fig.2). O ciclo biológico tem início quando as partículas virais penetram nas células da camada profunda, que são as células menos diferenciadas do epitélio escamoso, e que ainda têm atividade mitótica. O acesso do vírus a essas células é feito através de fissuras ou feridas.^(13,29,87,97) Ocorre, então, uma interação entre as proteínas do capsídeo e recetores específicos da superfície celular, há a penetração do vírus que perde o seu capsídeo, ficando o DNA exposto à ação de enzimas nucleares, o que favorece a expressão dos genes virais. Assim que o HPV infecta a célula, o genoma do vírus é mantido como elemento extracromossómico estável no núcleo (único local da célula

hospedeira onde ocorre replicação do vírus). ^(13,29,87,97) As cópias do genoma viral são replicadas até 50 a 100 cópias por célula. Quando as células infectadas se dividem há uma distribuição equivalente de genomas virais entre as células filhas que funcionam como um reservatório do genoma viral. Assim que a divisão celular é interrompida deixa, também, de haver replicação do vírus, não sendo necessária a expressão dos genes precoces. ^(13,19,29,87,97) Pensa-se que esta é a estratégia principal do HPV para se manter “camuflado”, de modo a não se tornar um alvo do sistema imune. Após esta primeira fase, o vírus pode ficar “hospedado” em células e/ou tecidos do hospedeiro sem apresentar qualquer tipo de sintoma, mantendo-se adormecido durante anos e, depois, tornar-se ativo como resultado de uma imunossupressão. ^(13,19,29,87,97)

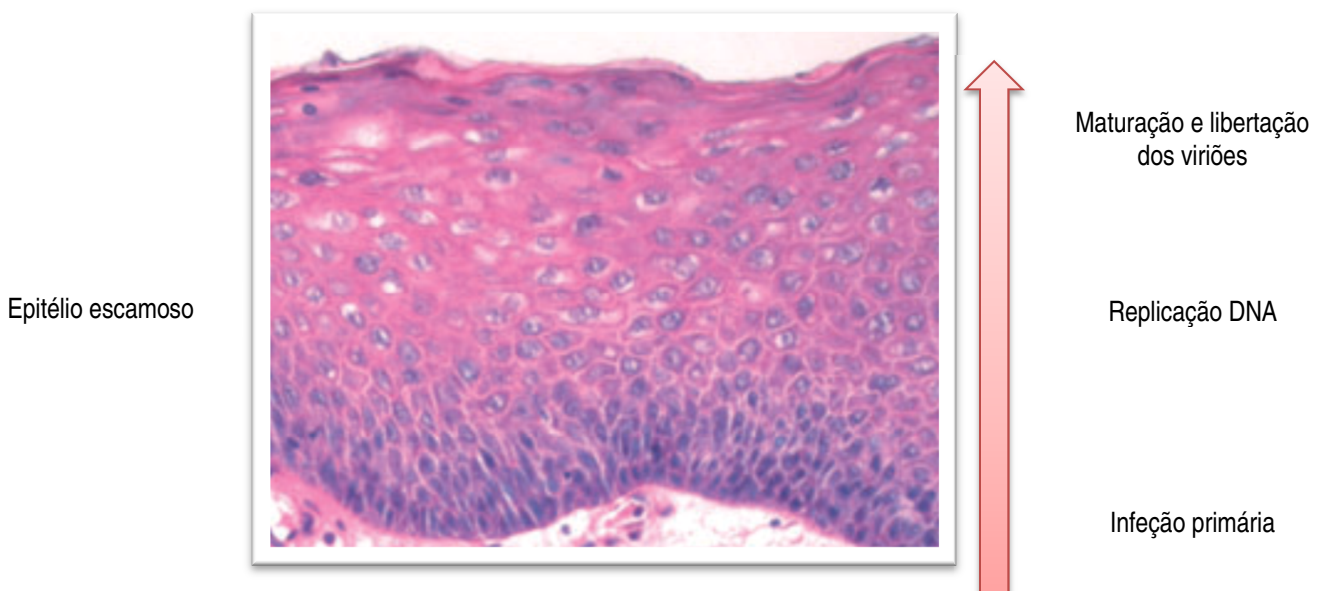


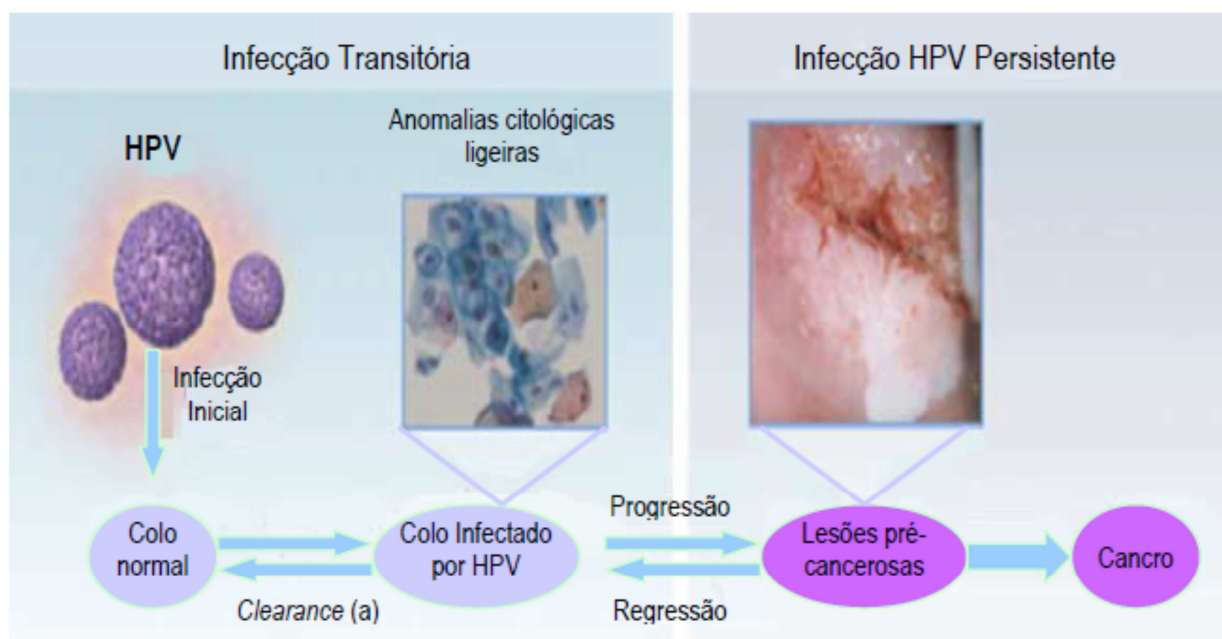
Fig.2 – Secção de tecido de um papiloma da laringe, corado pelo método hematoxilina-eosina. ⁽¹⁹⁾

A segunda fase corresponde à ativação da expressão do gene viral que leva a uma lesão verrugosa que pode, mas não obrigatoriamente, resultar na replicação extensiva do DNA viral e ao seu empacotamento em partículas infecciosas. ^(19,29) Nesta fase o ritmo da divisão das células aumenta provocando o aumento das camadas celulares antes que as células filhas se possam diferenciar, e assim há um aumento gradual da replicação do genoma viral e, consequentemente, maior produção de vírus. ^(19,29) Nestas lesões, a par do

aumento da replicação do DNA viral há também uma maior replicação do DNA do hospedeiro, aumentando a proliferação das células infetadas. É esta interação modulada que permite ao vírus manter uma infecção persistente a longo prazo, sem que haja uma grande resposta por parte do sistema imune do hospedeiro. (19,29)

As fases seguintes compreendem a infecção persistente por parte dos vírus de alto risco e podem resultar na progressão neoplásica até displasias de alto grau e/ou carcinomas onde o DNA viral é, normalmente, integrado no genoma do hospedeiro. (19,47) A expressão persistente de oncogenes dos vírus de alto risco leva a uma proliferação exagerada do tecido infetado e à acumulação de mutações seletivas no genoma do hospedeiro, aumentando o risco de progressão para displasias de médio e alto grau. (19,47) A capacidade do hospedeiro suportar a replicação do genoma viral e consequente produção de vírus diminui. Existem evidências de que o DNA viral se integra no DNA do hospedeiro antes das lesões se tornarem neoplásicas, progredindo mais rapidamente do que as lesões cujas células apresentam o DNA viral extracromossómico. (19,47) Na maioria das lesões de alto grau do cancro cervical, esta integração resulta, normalmente, na deleção de alguns dos genes precoces (E2, E4 e E5) e dos genes tardios (L1 e L2) do genoma do HPV o que, parece, ser requisito obrigatório para a transformação das células epiteliais. (19,47,105) As duas oncoproteínas, E6 e E7, ligam-se às proteínas p53 e Rb, respetivamente, degradando-as. Uma vez que a proteína E2 parece suprimir a transcrição das proteínas E6 e E7, a sua perda leva à maior produção das oncoproteínas, contribuindo para a transformação maligna. (105) Através da interação das E6 e E7 com as proteínas p53 e Rb, a expressão descontrolada das oncoproteínas pode causar a interrupção da regulação do ciclo celular levando a uma instabilidade genómica. (105)

A Figura 3 resume a carcinogénese do cancro do cólo do útero, onde se aplica o processo acima descrito. (114)

Fig.3 – Carcinogénese do colo do útero ⁽¹¹⁴⁾.

(a) Regressão para níveis não detectáveis.

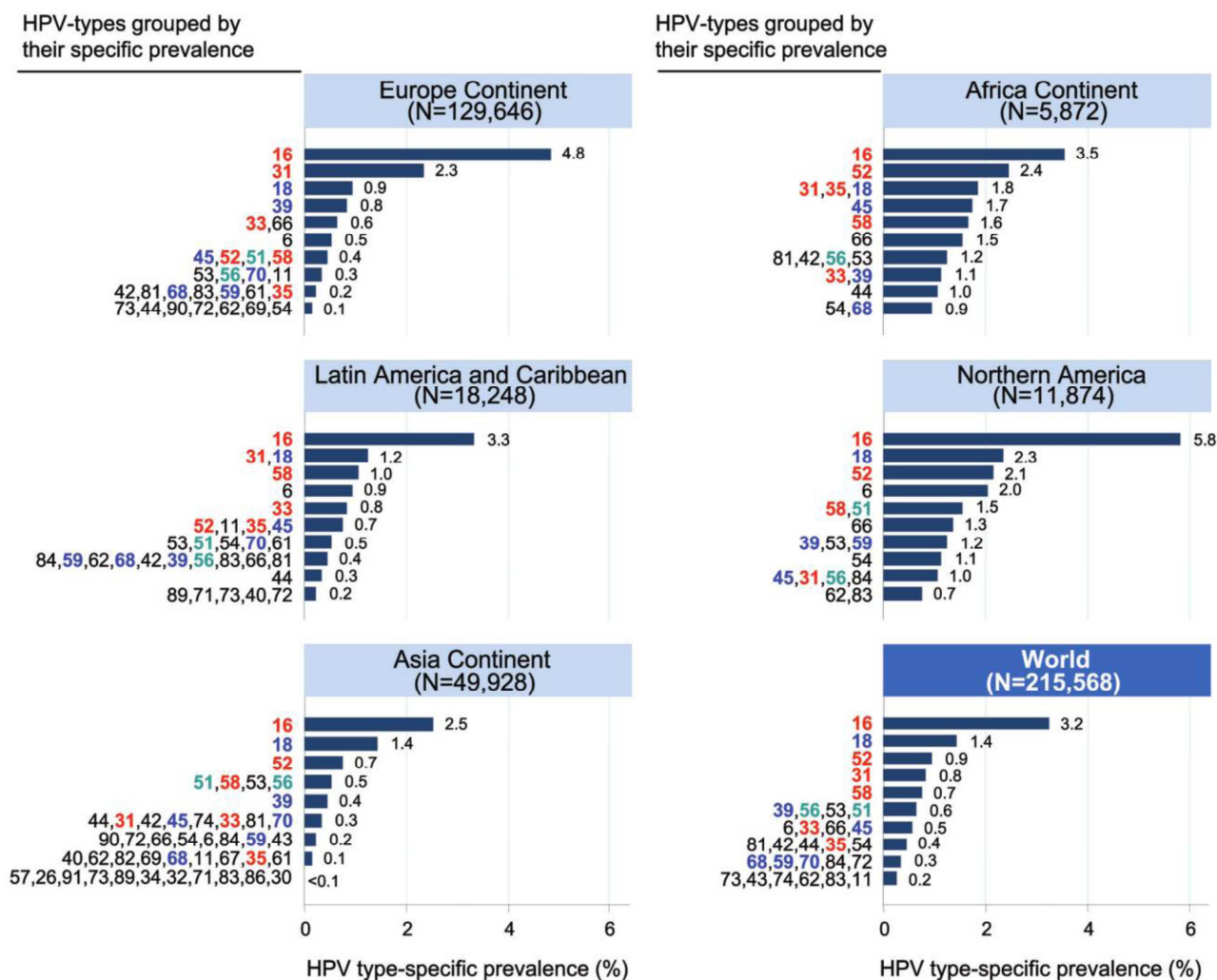
1.5 Prevalência

A prevalência do HPV nas mulheres é alta e variável nas várias regiões do mundo (Fig.4). O intervalo estimado de prevalência do HPV na população mundial situa-se, em média, entre os 6.1% e os 35.5%. ^(12,93) Vários estudos desenvolvidos em mulheres de todo o mundo mostraram que as regiões africanas e latino-americanas apresentam uma maior incidência de HPV do que as regiões europeias, asiática e norte-americana. ^(12,20,64) A distribuição por idades apresenta dois picos, um nos adolescentes (logo após o início da vida sexual) e o outro em idades mais avançadas (após os 45 anos). ⁽¹²⁾ Os HPV 16 e 18 são os tipos de vírus mais comuns, sendo o genótipo 16 o mais comum em todas as regiões do mundo. O HPV 18 e, seguidamente, os genótipos 52, 31, 58, 39, 56, 81, 35, 33, 45 e 51, apresentam prevalência semelhante nas várias regiões do mundo e são os mais comuns a seguir ao HPV 16. ^(12,20,64)

Em Portugal existe uma alta incidência deste vírus, estando, segundo dados obtidos em 2004, no 10º lugar entre os 27 membros da União Europeia. ⁽⁶⁸⁾ Não existem, ainda, muitos estudos epidemiológicos que caracterizem o vírus

HPV em Portugal, mas a informação existente até agora indica, tal como nos restantes países do mundo, que o tipo de vírus mais comum em Portugal é o HPV 16, e que cerca de 70% dos carcinomas resultam da infeção por HPV 16 e/ou 18. (68,114)

Fig.4 – Prevalência dos vários tipos de HPV nas várias regiões do mundo. (12)



2. Doenças associadas à infeção por HPV

A infeção pelo papilomavírus humano pode ocorrer nos tecidos cutâneos, nas mucosas da cavidade oral, do trato intestinal, do trato anogenital e na pele das mãos e dos pés. (34,96) O HPV apresenta um alto grau de tropismo celular específico para as células do epitélio escamoso e tem sido associado a vários

tipos de manifestações clínicas que vão desde lesões epiteliais hiperplásicas proliferativas, como verrugas, até ao cancro invasivo. ^(34,96) Estas lesões podem aparecer na pele ou no epitélio escamoso das mucosas genitais, orais, faríngeas e esofágicas. ^(34,96)

2.1 Lesões tumorais

Pelo menos 15 tipos de vírus foram já associados a lesões tumorais e, por isso, classificados como sendo de alto risco. São exemplos, os HPV 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82. A maioria dos vírus de alto risco está associada ao desenvolvimento do cancro no cólo do útero, vagina, vulva (nas mulheres), ânus, orofaringe e esófago. ⁽⁹⁶⁾

2.1.1 Cancro do cólo do útero

O carcinoma do epitélio escamoso das células do cólo do útero, um cancro maligno da mulher, desenvolve-se a partir de uma série de lesões pré-cancerosas com uma displasia celular aumentada que é, normalmente, denominada de neoplasia cervical intraepitelial (“cervical intraepithelial neoplasia” – CIN). Esta neoplasia é classificada, histologicamente, como CIN1, CIN2 e CIN3 conforme a gravidade da lesão. ^(52,66,96,105) O grau CIN 1 corresponde a uma displasia ligeira, com alterações celulares atípicas de pouca gravidade que, normalmente, regredem espontaneamente. ^(51,71,111) O grau CIN 2 corresponde a uma displasia de gravidade média a elevada, com alterações celulares atípicas mais graves. Por fim, o CIN 3 corresponde a uma displasia severa, apresentando alterações celulares atípicas muito graves. As lesões de grau CIN 2 e 3 estão associadas ao maior risco de progressão para carcinoma invasivo. ^(51,71,111) Esta classificação tem recebido críticas algo controversas pelo facto de depender da avaliação visual dos técnicos/clínicos que realizam o exame histológico. ^(23,24) Deste modo, surgiu um novo sistema de classificação, o Sistema Bethesda (Tabelas 2 e 3). Este sistema foi implementado em 1988 e revisto diversas vezes, a última das quais em 2001. Neste sistema de classificação, as lesões intraepiteliais escamosas (“squamous intraepithelial lesions” - SIL) são classificadas como lesões de baixo grau (low-grade SIL - LSIL) e lesões de alto grau (high-grade SIL

- HSIL). As LSIL correspondem às lesões de grau CIN 1 e as HSIL correspondem às de grau CIN 2 e CIN 3. Tal como o primeiro sistema de classificação, esta correlação não é consensual entre os vários autores. ^(9,56,67,71) Por este motivo foi introduzida uma nova categoria denominada de células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical squamous cells of undetermined significance – AS-CUS) que corresponde a alterações citológicas semelhantes às SIL, mas com evidências insuficientes para determinar o diagnóstico. ^(2,9,56,67)

O cancro do cólo do útero é o segundo tipo de cancro mais comum nas mulheres, com aproximadamente 510.000 novos casos e 288.000 mortes registadas anualmente em todo o mundo. ^(14,66,96,105) Em Portugal, os dados existentes apontam para cerca de 1000 novos casos todos anos (1090 casos em 2005), com uma taxa de incidência de 20.95/100.000 mulheres (todas as idades). ⁽¹¹⁴⁾ Estudos realizados em todo o mundo e ao longo do tempo confirmaram a presença do DNA do HPV em quase 100% dos epitélios dos carcinomas invasivos, levando à tese mundialmente aceite de que a infeção pelo vírus HPV é “causa necessária para o desenvolvimento do carcinoma invasivo”. ^(14,66,96,105) Casos de carcinomas sem a presença do vírus HPV são raros e supõe-se, nestas situações, que o carcinoma não foi originado pela infeção viral ou possa ter ocorrido falha na deteção do vírus HPV. ^(66,96,105) Devido à discrepância entre a alta frequência de infeções HPV em mulheres jovens sexualmente ativas e a ocorrência relativamente baixa de lesões cervicais nas mesmas, colocou-se em dúvida a etiologia viral da doença, e concluiu-se que a infeção era causa necessária, mas “não suficiente para o desenvolvimento da doença”, uma vez que, virtualmente, somente uma fração de mulheres portadoras do vírus a desenvolveria. ^(66,96,105) Estudos prévios já sugeriram que um forte fator diferenciava a progressão ou não da doença, sugerindo que tal estaria relacionado com os diversos tipos do vírus HPV. Estudos posteriores mostraram que a sua progressão depende não somente da presença do vírus, mas também do tipo de vírus, da persistência da infeção e da evolução das lesões precursoras para o carcinoma invasivo. ^(66,96,105)

Os vírus de alto risco estão presentes na grande maioria dos casos deste tipo de cancro. Estima-se que os tipos de HPV 16 e 18 estarão presentes em mais de 80% dos casos de CIN3 e cerca de 50% dos casos de CIN2. ^(66,96)

2.1.2 Cancro da vagina

O cancro da vagina é um tipo de cancro menos frequente nas mulheres, tendo sido registada uma taxa de 0.3-0.7 em 100.000, em todo o mundo. ^(31,96) O número de estudos que associa esta doença ao HPV é limitado, e têm sido apenas realizados em tecidos fixados e em apenas alguns tipos de vírus. Estudos epidemiológicos demonstram que o cancro da vagina se assemelha ao cancro do colo do útero e que foram detetadas sequências de DNA de HPV neste tipo de lesões. O tipo de vírus mais comum nesta neoplasia é o HPV16. ^(31,96)

2.1.3 Cancro da vulva

A taxa mundial deste tipo de cancro é de 0.5-1.5 em 100.000. A etiologia dos cancros vulvares é heterogénia e, por isso, a presença de infeção por HPV varia. Os casos de histopatologia basal estão normalmente associados ao HPV. ^(63,96) Em 66 a 100% destes casos tem sido possível detetar o genoma do HPV de alto risco, especialmente do HPV 16. Por outro lado, os cancros da vulva associados a verrugas não são, usualmente, provocados pelo HPV. ^(63,96)

2.1.4 Cancro do ânus

O cancro do ânus é aquele que surge no canal anal. Os tumores encontrados na pele externa são considerados cancros da pele e não do ânus. É um cancro raro na generalidade da população (1.5 casos em cada 100.000 pessoas), sendo os homossexuais os mais afetados. ^(69,96) Este tipo de cancro é, também, mais frequente em indivíduos previamente infetados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Vários estudos chegaram à conclusão de que cerca de 26 a 73% destes cancros podem estar associados ao HPV. ^(69,96)

2.1.5 Cancro do pénis

O cancro do pénis é um tipo de cancro raro, com uma incidência inferior a 0,5% entre todos os cancros que ocorrem no homem. ^(86,96) O facto de ser comum

a coexistência entre o cancro do pênis e o cancro do colo do útero em casais que vivam maritalmente sugere que a etiologia destas duas doenças é semelhante. Cerca de 40 a 50% dos cancros do pênis são provocados pela infeção por HPV e os tipos de vírus mais encontrados são os HPV 16 e 18. ^(86,96)

2.1.6 Cancro do ovário

Este tipo de cancro é mais comumente formado no revestimento epitelial do ovário originando o cancro do ovário, ou nos óvulos, originando tumores nas células germinativas. ^(96,119) O cancro do ovário é a 5ª causa de morte por cancro nas mulheres e a principal causa de morte por cancros ginecológicos. O papel da infeção por HPV neste tipo de cancro não está claro e os resultados diferem nas várias zonas do mundo, gerando uma certa controvérsia. ^(96,119) Há estudos que indicam que os tipos de vírus 16 e 18 têm um papel importante no desenvolvimento do cancro do ovário, havendo, contudo, outros que afirmam não haver relação direta entre o vírus e a doença. ^(96, 119)

2.1.7 Cancro oral

O cancro das células escamosas da boca é o 6º cancro mais comum em todo o globo, sendo a causa de 5% de todos os cancros malignos no mundo. ^(85,96) Apesar de uma grande parte dos cancros orais serem devido ao consumo de álcool e tabaco, uma fração significativa apresentam infeção por HPV anogenital. O HPV 16 parece ser o mais frequente neste tipo de neoplasia. ^(85,96)

2.1.8 Outros cancros

Foram também desenvolvidos estudos associando o HPV ao cancro do pulmão, cancro do esófago, cancro da laringe, cancro nasofaríngeo, cancro da bexiga, cancro do estômago, cancro do olho e cancro da mama. ⁽⁹⁶⁾

2.2 Lesões não tumorais

Estas lesões são mais comumente associadas aos tipos de HPV de baixo risco, principalmente, HPV 6 e 11. ⁽⁹⁶⁾

2.2.1 Verrugas genitais

Estudos recentes demonstraram que a grande maioria das verrugas genitais são causadas pelos HPV 6 ou 11, mas outros estudos indicaram que parte destas infecções pode apresentar coinfeções com vírus de alto risco. ^(83,96) As verrugas genitais são transmitidas, principalmente, pela via sexual e são comuns em cerca de 1-2% da população sexualmente ativa. Os primeiros dados relativos a este tipo de lesão foram obtidos a partir de poucos estudos epidemiológicos que indicavam a presença de HPV em 46-83% dos casos. ^(83,96) No entanto, com o aparecimento de técnicas mais avançadas na detecção deste vírus, vários estudos publicados entre 1982 e 2000 indicavam uma prevalência do HPV entre os 58.8% e os 100%, valores que foram novamente corrigidos mais recentemente por outros estudos que revelam que o HPV está presente em mais de 90% dos casos, chegando a atingir os 100% nalguns dos trabalhos publicados. ^(83,96)

2.2.2 Verrugas nas mãos e nos pés

As verrugas vulgares são provocadas pela infecção por HPV e apresentam uma alta incidência em todo o mundo. ^(35,102) Ocorrem normalmente nas mãos e nos pés e podem afetar a qualidade de vida devido ao seu aspeto pouco estético, à dor que podem provocar e à possibilidade de contágio. As verrugas plantares (dos pés) mais profundas estão associadas ao HPV 1, enquanto as verrugas nas outras zonas do corpo estão mais associadas ao HPV 4. ^(35,102) O vírus entra através da superfície celular após contacto direto com alguém infetado ou com vírus recentemente derramado num ambiente húmido e quente que o manteve ativo. O período de incubação do vírus vai de 1 a 8 meses e são mais comuns nas crianças e adolescente, especialmente em jovens atletas. ^(35,102)

2.2.3 Papilomatose respiratória recorrente

Também conhecida como papilomatose da laringe, esta infecção é rara e é caracterizada pelo crescimento recorrente de papilomas benignos no trato

respiratório, mais comumente na laringe. ^(96,97) Os papilomas laríngeos de início juvenil são associados aos HPV transmitidos por via vertical de uma mãe com infecção anogenital ativa ou latente. Mais de 30% de mães com condilomas genitais deram à luz crianças que desenvolveram papilomatose laríngea de início juvenil. ^(96,97) A papilomatose laríngea juvenil acomete ambos os sexos e o fator mais preocupante é disseminação do vírus pela árvore traqueobronqueal, evoluindo para a papilomatose pulmonar, muitas vezes resultando numa infecção incontrolável e fatal. ^(96,97) Outro evento importante é a transformação maligna dos papilomas laríngeos que apesar de ser um evento raro, ocorre em cerca de 3 a 7% dos casos. Os tipos de vírus mais encontrados neste tipo de infecção são os HPV 6 e 11, sendo o HPV 6 o mais frequente, apesar de o HPV 11 estar associado aos casos mais graves. ^(96,97)

3. Resposta Imunitária do Hospedeiro

Uma grande parte das mulheres infetadas com um tipo específico de HPV podem, ao fim de 6-12 meses, já não o apresentar. Estima-se que cerca de 75% da população sexualmente ativa entre em contacto com um ou mais tipos de HPV durante a sua vida. ^(6,14,47,90) A grande maioria destas infeções é, no entanto, eliminada pelo sistema imune e não desenvolvem sintomas no hospedeiro. Alguns estudos demonstraram que após um determinado período de tempo estas mulheres estavam, aparentemente, sem infeção. ^(6,14,47,90) Continua, todavia, por esclarecer se isto significa que a infeção foi definitivamente eliminada pelo sistema imune do hospedeiro ou se existe um período de latência do vírus em que os seus níveis estão tão baixos que são indetetáveis pelos meios de diagnóstico disponíveis. ⁽⁶⁾

Exames histológicos de verrugas genitais em regressão revelaram a presença de um infiltrado de células T (CD4+ e CD8+) e macrófagos. Os linfócitos encontrados demonstraram expressar marcadores de ativação, citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF α e IFN γ) e uma regulação de moléculas de adesão necessárias ao tráfico de linfócitos no endotélio dos capilares das verrugas. ^(14,47,103) Estas evidências são características de uma resposta imune mediada por células e foram também observadas em estudos com modelos animais. Assim, é

possível afirmar que, pelo menos nos vírus de alto risco, a resposta das células T CD4+ contra, aparentemente as proteínas E2 e E6, é importante para o combate à infecção. Outros estudos demonstraram que a citotoxicidade celular também pode atuar neste tipo de infecções virais. ^(28,103) Alguns estudos serológicos evidenciaram que a infecção por HPV é, normalmente, seguida pela produção de um anticorpo com especificidade contra a proteína major do capsídeo, a L1. A seroconversão ocorre mais frequentemente entre os 6 e os 18 meses após a primeira detecção em indivíduos com infecção persistente. ^(6,14,28,103) No entanto, esta seroconversão não ocorre em todos os casos e mesmo ocorrendo, o nível de anticorpos é baixo. Uma questão controversa é saber se estes anticorpos protegem ou não contra uma reinfeção pelo mesmo vírus. ^(28,103) A proteína L2 está situada mais internamente na cápside, mas há um pequeno segmento que está exposto à superfície e que também pode ser reconhecido por anticorpos. Estes anticorpos não são tão potentes como os anticorpos L1, mas demonstram reatividade cruzada com vários tipos de HPV. ^(28,103) É, assim, possível concluir que o HPV é um vírus que impede o funcionamento normal do sistema imune, mas não evita que, eventualmente, este possa responder à infecção, controlando-a e estabelecendo a memória imune. ^(6,28,103)

4. Transmissão

A grande maioria das infecções por HPV é transmitida através do contacto direto com lesões infecciosas. No entanto, as características das lesões implicadas na transmissão não estão ainda definidas. Indivíduos sem lesões aparentes também podem transmitir o vírus. ⁽³⁰⁾

4.1 Transmissão por via sexual

O HPV é eficazmente transmitido entre parceiros sexuais. A infecção por HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo. ^(46,49,99) Vários estudos sugerem que 80% das mulheres sexualmente ativas ao atingir os 50 anos de vida já terão sido infetadas pelo HPV em algum ponto da sua vida. Pensa-se que o homem será o “reservatório” do vírus que infetará a mulher, mas pouco se sabe ainda da história do vírus nos homens. ^(46,49,99)

Quanto mais cedo se inicia a vida sexual, maior a probabilidade de se vir a contrair o vírus, principalmente os tipos de alto risco. Os comportamentos sexuais de risco, tais como, a não utilização do preservativo ou a manutenção de parceiros sexuais múltiplos, estão também diretamente relacionados com o maior risco de se contrair a infecção. ^(33,60,73)

Estudos efetuados em casais heterossexuais evidenciaram que 75% das mulheres cujos parceiros masculinos eram portadores de HPV eram também seropositivas para este vírus, enquanto apenas 39% dos homens com parceiras portadoras de HPV eram seropositivos para o vírus. ^(49,73) As diferenças nestes valores podem ser devido às diferenças anatómicas entre os dois sexos. Neste estudo, o eixo do pênis foi a principal fonte de transmissão para o colo do útero, enquanto o colo do útero e a urina da mulher foram os principais focos de infecção para os órgãos genitais masculinos. A transmissão sexual também pode envolver o escroto, o ânus da mulher e até as mãos de ambos os sexos. ^(49,73)

Ao considerar casais de mulheres exclusivamente lésbicas, especula-se que o vírus HPV apenas poderia ser transmitido através de sexo oral, mas foram encontrados outros focos de infecção, sugerindo que a partilha de brinquedos sexuais com penetração vaginal nas duas parceiras pode também constituir uma forma de transmissão. ⁽⁵⁾

Nos casais de homens homossexuais os carcinomas anais ocorrem com mais frequência, ao contrário dos carcinomas do pênis que parecem ocorrer com a mesma frequência entre homossexuais e heterossexuais. ⁽³⁴⁾

4.2 Transmissão por via vertical - mãe/filho

Apesar do HPV ser maioritariamente transmitido por via sexual, este vírus também pode ser transmitido pela grávida ao filho, antes ou durante o parto. A frequência com que este tipo de transmissão pode ocorrer tem originado controvérsia entre os vários estudos concretizados. A sua prevalência pode ter, no entanto, um impacto importante nas estratégias de vacinação e no planeamento familiar de mulheres infetadas antes de engravidarem. ^(89,99,100) Daí ser importante clarificar a frequência da transmissão vertical para este tipo de vírus, bem como determinar se os vírus detectados nas mães e nos respetivos

filhos são do mesmo tipo (num ambiente controlado para outros potenciais fatores de transmissão).^(89,99,100) A transmissão vertical pode ocorrer durante a passagem do feto através do canal de parto infetado ou por infecção ascendente, especialmente após rutura precoce das membranas. No útero a transmissão pode ocorrer quer por infecção ascendente a partir do canal do parto infetado, quer pelo esperma usado em casos de fertilização, ou por via transplacentar.^(89,99,100) O DNA viral do HPV foi detetado em células mononucleares do sangue periférico de mulheres grávidas, em amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos, em secreções orofaríngeas de recém-nascidos, em fluido amniótico, em membranas fetais, em células trofoblásticas da placenta e em células de material resultante de abortos espontâneos.^(89,99,100)

4.3 Outras formas de transmissão

Outras formas de transmissão já estudadas são: transmissão horizontal de outros membros da família com contacto próximo, autoinoculação de um local para outro e possível transmissão indireta via *phomites*, isto é, focus externos de infecção.^(89,106)

5. **Fatores de risco**

5.1 Comportamentos sexuais

Vários estudos concluíram que quanto maior o número de parceiros sexuais ao longo da vida, maior o risco de contrair infecção por HPV. Foi também possível observar o facto de que uma pessoa, cujo cônjuge teve muitos parceiros sexuais ao longo da vida ou mantém relações extraconjugais, tem também este risco aumentado.^(6,33,46,60,98) Outro fator de risco é o tempo que um casal espera, desde o início de uma relação, para o seu envolvimento sexual. Quanto menor for este tempo maior a probabilidade de se contrair a infecção. Estudos complementares concluíram também que quanto mais cedo se inicia a vida sexual, maior a probabilidade de se vir a contrair o vírus, principalmente os tipos de alto risco.^(6,33,46,60,98)

5.2 Tabaco e álcool

A infecção por HPV tem sido associada com o ato de fumar, quer em fumadores ativos quer em ex-fumadores. No entanto, nenhum estudo conseguiu mostrar, ainda, o porquê desta associação nem inferir se o tabaco poderá estar diretamente relacionado com a gravidade da infecção. ^(6,33, 98,120)

O álcool também tem sido relacionado com o risco de contrair a infecção por HPV, associação essa que se pensa ser devida ao estado alterado em que as pessoas ficam aquando o seu consumo, pelo que poderão apresentar comportamentos sociais e sexuais de risco. ⁽⁹⁸⁾

5.3 Uso de contraceptivos orais

A possível relação entre o uso de contraceptivos orais e o risco de contrair infecção por HPV é difícil de avaliar devido à associação deste método e a atividade sexual. ^(6,33,113) Os estudos efetuados para realizar esta avaliação têm sido contraditórios, no sentido que há estudos que afirmam haver uma relação e outros que não encontram relação alguma, para além do facto de que o uso destes contraceptivos está relacionado com o risco aumentado das lesões cervicais se transformarem em cancerosas. ^(6,33,113)

5.4 Outras infeções sexualmente transmissíveis

Vários estudos têm mostrado que história clínica de outras infeções sexualmente transmissíveis também pode ser um fator de risco para a contração do vírus do HPV, uma vez que o sistema imune está mais debilitado. ^(82,98) A presença de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) poderá também estar relacionada com comportamentos sexuais de risco que podem, eventualmente, levar à contração da infecção por HPV. ^(82,98)

6. Diagnóstico

Para além do diagnóstico clínico de cada uma das doenças associadas ao HPV, como é exemplo o Teste de Papanicolaou para a deteção do cancro do cólo do útero, existem formas de diagnóstico complementares que detetam a presença do vírus e determinam qual o tipo de vírus que está a provocar a infecção. ^(15,44) Estes testes foram desenvolvidos com o objetivo de complementar os testes

convencionais e superar as suas limitações. Estas novas técnicas de diagnóstico baseiam-se sobretudo em métodos serológicos ou moleculares, sendo estes últimos mais específicos e sensíveis. ^(15,44)

6.1 Citologia/Teste de Papanicolau

Há cerca de 60 anos atrás o cancro do colo do útero era uma causa frequente de morte nas mulheres, mortalidade que diminuiu cerca de 50% desde essa altura. Esta redução deve-se essencialmente ao desenvolvimento da técnica de deteção citológica conhecida como Teste de Papanicolau, que deve o seu nome ao investigador que o implementou. ^(1,95) Em 1920, George Papanicolaou iniciou os seus estudos em citologia vaginal e alguns anos mais tarde observou, pela primeira vez, células cancerosas num esfregaço de células epiteliais do colo do útero. Na década de 40 foi implementado o teste Papanicolau e desde então este tem sido a ferramenta mais utilizada para a deteção do cancro do colo do útero. ^(1,15,27,44,95)

O teste Papanicolau consiste na análise microscópica de esfregaços obtidos por raspagem das células epiteliais do colo do útero, durante o exame ginecológico, com o objetivo de detetar anomalias nas células não visíveis a olho nu. ^(21,112) Após a recolha das células, estas podem ser fixadas diretamente numa lâmina - citologia convencional - ou então, recorrendo ao uso de uma espátula específica para o efeito, as células podem ser introduzidas num meio líquido de modo a obter-se uma suspensão celular – citologia líquida. ⁽¹¹⁸⁾ A citologia convencional tem apresentado algumas limitações, incluindo um elevado número de falsos negativos, devido à falta de células endocervicais em número suficiente. Estes falsos negativos impedem a deteção precoce de células anormais e/ou cancerosas, podendo elevar a taxa de morbilidade e mortalidade. ^(1,70,95) Daí que a citologia líquida tenha vindo a substituir, gradualmente, a convencional, devido à sua excelente fixação, à homogénea dispersão do material celular e à diminuição da presença de material não celular que poderia afetar o bom desempenho do teste. Além disso, a citologia líquida permite também que a mesma amostra possa ser usada na deteção do DNA viral do HPV, através de técnicas moleculares. ^(70,95,107)

Outra correção feita ao longo dos tempos foi a forma de apresentação dos resultados. Para além de se proceder a uma avaliação prévia da amostra também é considerada a presença de microrganismos, mesmo que este não seja o principal objetivo deste exame. ^(70,107) A classificação internacional das alterações citológicas, também adotada em Portugal, é denominada de Sistema de Bethesda. ⁽¹¹⁴⁾ As Tabelas 2 e 3 resumem a forma como os resultados são apresentados com base neste sistema.

Tabela 2 – Adequação da amostra - Sistema de Bethesda. ⁽²⁾

Adequação da amostra (<i>Specimen adequacy</i>)	Satisfatória para avaliação
	Satisfatória para avaliação, mas limitada por... (especificar razão)
	Insatisfatória para avaliação (especificar razão)

Tabela 3 – Interpretação dos resultados - Sistema de Bethesda. ⁽²⁾

Interpretação dos resultados		
Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna		Sem qualquer alteração (Normal)
	Microrganismos:	<p>- <i>Trichomonas vaginalis</i>.</p> <p>- Organismos fúngicos compatíveis com <i>Candida spp.</i></p> <p>- Desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana.</p> <p>- Bactérias morfológicamente consistentes com <i>Actinomyces spp.</i></p> <p>- Alterações celulares consistentes com o Vírus Herpes Simplex.</p>
	Outros achados não neoplásicos:	<p>- Alterações celulares reativas associadas com inflamação, radiação ou dispositivo intrauterino (DIU).</p> <p>- Células glandulares pós histerectomia.</p>

		- Atrofia.
Anomalias das células epiteliais	Células escamosas:	Células escamosas atípicas: - de significado indeterminado (ASC-US) - não se excluindo lesão intraepitelial de alto grau (ACS-H)
		Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), incluindo HPV, displasia ligeira e neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (CIN1)
		Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), incluindo displasia moderada a severa, carcinoma <i>in situ</i> e CIN 2 e 3.
		Carcinoma das células escamosas
	Células glandulares	Células glandulares atípicas
		Células glandulares atípicas favorecendo a neoplasia
		Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i>
		Adenocarcinoma
Outra	Células endometriais em mulheres com mais de 40 anos de idade.	

6.2 Colposcopia

A colposcopia é uma técnica visual usada para complementar a citologia nos rastreios do cancro do cólo do útero. ⁽¹¹⁷⁾ Consiste no exame visual do cólo uterino através de um instrumento, o colposcópico, que não é mais do que um microscópio de campo binocular com uma fonte de luz poderosa que permite a visualização de possíveis lesões nas células epiteliais do cólo do útero. É considerado um método secundário de triagem recomendado nos casos de testes de rastreio positivo. ⁽¹¹⁷⁾

6.3 Testes serológicos

Estas provas são baseadas na deteção de anticorpos circulantes e da resposta imunitária ao nível celular induzida pela infeção viral, que inclui a

deteção dos anticorpos produzidos contra os péptidos das regiões E2, E4, E6, E7, L1 e L2 e de anticorpos produzidos contra as proteínas transformantes E6 e E7 e as proteínas capsulares L1 e L2. ^(10,44) Este tipo de testes tem menor sensibilidade do que os testes moleculares. A deteção de anticorpos pode ser, no entanto, usada como um marcador da exposição persistente ao HPV em mulheres normais e está em desenvolvimento, como marcador de disseminação metastásica, em pacientes com carcinoma. ^(10,44)

6.4 Testes moleculares

Surgiram da necessidade de colmatar as limitações dos tipos de testes citológicos e imunológicos. ^(15,44) A existência de falsos negativos e os custos avultados que seriam necessários para automatizar os métodos de diagnóstico citológicos fez com que diversos estudos tivessem sido levados a cabo com o intuito de se encontrarem métodos de diagnóstico cuja sensibilidade e fiabilidade fossem muito maiores permitindo assim a redução de falsos resultados e, ao mesmo tempo, a redução de custos em programas de saúde pública. ^(15,44)

O risco oncogénico das infeções por HPV foi determinante para a implementação dos métodos de diagnóstico molecular que permitem a deteção direta do vírus, o estudo da progressão das lesões e o acompanhamento e monitorização adequados dos doentes infetados. ^(15,44) Também foi proposta a introdução destes métodos como testes de diagnóstico primário nos países em desenvolvimento, uma vez que estes têm programas de rastreio deficitários. ^(15,44)

Estudos recentes identificaram quatro aplicações principais deste tipo de métodos de diagnóstico: a triagem das mulheres com lesões citológicas de menor grau, o acompanhamento de utentes com lesões citológicas mas com biópsia negativa, a avaliação da terapêutica profilática após tratamentos de neoplasias cervicais, teste primário de rastreio acompanhado ou não de outros exames para a deteção de precursores do cancro cervical. ^(81,115)

Tendo em conta o tipo de alvo a procurar, os testes de deteção do HPV podem ser divididos em quatro grupos: métodos baseados na deteção qualitativa do DNA do HPV (genótipos de alto risco), métodos que acrescentam aos anteriores dão a genotipagem individual dos vírus de alto risco mais frequentes,

métodos que detetam o(s) genótipo(s) indicando qual(ais) o(s) tipo(s) de vírus presente na infecção e métodos que detetam o mRNA do HPV. ⁽¹¹⁵⁾

Vários estudos têm demonstrado a dificuldade em obter o mesmo padrão de resultados para os diferentes testes moleculares, em particular nos casos de infecção causada por múltiplos vírus e/ou por baixas cargas virais. ⁽²⁵⁾ É absolutamente necessária a disponibilidade de métodos moleculares com uma performance clínica de confiança antes destes poderem ser utilizados, de forma exclusiva, para o rastreio do cancro cervical. ⁽²⁵⁾

Os métodos moleculares standard para o diagnóstico do HPV são heterogêneos e podem ser classificados como amplificações de sinal (técnicas de hibridação), amplificações alvo (PCR e variantes) ou outros tipos de tecnologias como é exemplo os microarrays. ^(115,44)

Neste trabalho serão referidos apenas alguns dos métodos comercialmente usados.

6.4.1 Amplificação de sinal

Testes baseados num passo inicial de hibridação dos ácidos nucleicos na amostra com recurso a uma sonda-alvo específica, em fase líquida ou *in situ* nas células e tecidos, onde o sinal é amplificado e finalmente visualizado. ^(44,101)

O teste mais conhecido desta categoria é a Captura Híbrida, *digene* Hybrid Capture 2 HPV DNA assay (Qiagen, Inc., Gaithersburg, MD). ^(18,44,81,101,115) Foi o primeiro método aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a deteção do HPV e é um processo qualitativo/semi-quantitativo. ^(44,74,84) Consiste na hibridação, em formato de microplaca, do DNA libertado da amostra com recurso a sondas RNA específicas para a identificação de 13 tipos virais de alto risco e 5 tipos de vírus de baixo risco, classificando-os, apenas, como de alto ou baixo risco. ^(18,44,81,101,115) Este teste não identifica os tipos virais individualmente. Os híbridos DNA:RNA são capturados sobre uma superfície que contém anticorpos específicos para estes híbridos que, seguidamente, reagem com anticorpos conjugados com fosfatase alcalina. ^(18,44,101,115) Esta associação é detetada por um substrato quimioluminiscente produzindo um sinal amplificado, pelo menos 3000 vezes, que é medido por quimioluminiscência. ^(18,44,101,115) Esta

é, posteriormente, comparada com a quimioluminiscência dos controlos positivos, permitindo determinar a carga viral que pode ser correlacionada com a natureza da patologia. ⁽⁴¹⁾ Este tipo de ensaio é tecnicamente simples, acessível a laboratórios que não possuam aparelhos de PCR e está disponível num formato semi-automático. É um método sensível e com um baixo número de falsos negativos. No entanto, alguns estudos colocaram em questão a sua fiabilidade devido à possível reação cruzada entre as sondas e alguns vírus de baixo risco não detetados pelo teste, o que pode originar falsos positivos. ^(44,81,101,115)

Um outro método baseado na amplificação de sinal mais recente que também já foi aprovado pela FDA é o Cervista HR HPV test (Hologic, Madison, WI, USA) que é um teste qualitativo e deteta 14 tipos de HPV de alto risco. ^(80,101) Este teste foi concebido para detetar sequências específicas de ácidos nucleicos, usando, para isso, 3 conjuntos de sondas. Os resultados são expressos, através de uma reação de fluorescência, como negativos ou positivos para cada conjunto de sondas. ^(80,101) Existem poucos estudos efetivos sobre este método de deteção. Um desses estudos afirma que este teste parece menos sensível que a Captura Híbrida, apesar da razão para essa afirmação poder ser a sua maior especificidade. Isto é, a Captura Híbrida deteta mais casos positivos, mas isso pode dever-se ao facto de ser menos específico uma vez que a sua reactividade cruzada pode levar à deteção de vírus de baixo risco, apresentando, assim, falsos positivos. Pensa-se, por isso, que o Cervista HR HPV test possa reduzir o número de falsos positivos apresentados pela Captura Híbrida. ⁽¹²¹⁾

6.4.2 Amplificação alvo

O método mais comum deste tipo de amplificação é a PCR. Têm sido desenvolvidos vários testes para uso da PCR com diferentes sistemas de leitura. Apesar do DNA ser o alvo preferencial na PCR, o mRNA também pode ser amplificado (RT-PCR). ⁽¹⁰¹⁾

Um dos testes comerciais usados é o AMPLICOR HPV Test, que consiste na amplificação do DNA do vírus (uma sequência do gene L1 do HPV) seguida de hibridação dos ácidos nucleicos para identificação de 13 genótipos de alto risco oncogénico, os mesmos 13 que na Captura Híbrida. ^(44,80,116) É um teste

qualitativo, uma vez que os resultados são apresentados como positivo ou negativo. Conjuntamente com outros tipos de exames de diagnóstico, o AMPLICOR HPV Test pode ser uma ferramenta poderosa na deteção de lesões de alto risco oncogénico. ⁽⁴⁴⁾ Uma das vantagens comparativamente com a Captura Híbrida é que, adicionalmente, este teste pesquisa a presença de um gene humano – globina – para controlo interno da amplificação e da qualidade da amostra biológica. Utiliza menos quantidade de amostra e é, à partida, mais sensível e reprodutível do ponto de vista analítico que os métodos anteriormente referidos. ^(44,80,116) No entanto, a Captura Híbrida apresenta uma maior sensibilidade e especificidade clínica, devido, possivelmente ao alto grau de reactividade cruzada. Este facto é comprovado por diversos estudos que afirmam que a Captura Híbrida detetou positividade nalguns casos de CIN 3 provocados por tipos de HPV que não se encontram no grupo alvo destes testes, algo que não aconteceu no AMPLICOR HPV Test. ^(44,115,116)

Outro tipo de teste amplificação-alvo é o The Roche Linear Array HPV que é um teste qualitativo para a deteção do HPV em amostras clínicas e consiste na hibridação reversa de produtos de amplificação obtidos por PCR usando primers biotinilados para sondas específicas imobilizadas num substrato sólido. ^(44,53) A hibridação é detetada por uma reação colorimétrica. É amplificada uma região polimórfica do gene L1 da cápside do HPV que pode detetar 37 genótipos de HPV diferentes. É uma metodologia reproduzível, precisa e com utilidade clínica na deteção e identificação de um amplo grupo de genótipos de HPV. ^(44,53) É, no entanto, tal como o AMPLICOR HPV Test, uma técnica dispendiosa que requer equipamento especializado que não se encontra em qualquer laboratório. Segundo vários estudos efetuados a reprodutibilidade deste teste é muito semelhante à do AMPLICOR HPV Test. ^(44,53)

Um dos novos conceitos para tentar aumentar a especificidade da deteção do HPV é o desenvolvimento de testes de amplificação de ácidos nucleicos baseados na deteção do mRNA dos genes E6 e E7. ^(80,109,115) Pensa-se que este tipo de deteção possa prever a progressão das lesões neoplásicas, uma vez que a expressão aumentada das proteínas E6 e E7 é uma das condições necessárias para o desenvolvimento da neoplasia cervical. ^(80,109,115) Foram efetuados, no

entanto, poucos estudos ainda, pelo que não é possível aferir se efetivamente são mais específicos que os testes que detetam o DNA do vírus. Os estudos desenvolvidos com esse intuito têm sido pouco conclusivos. ^(80,109,115) Atualmente, existem três testes comerciais que usam este método: Norchip Proffer Assay (também designado por PreTect HPV-Proofer) e The NucliSENS EasyQ HPV V1 assay que detetam 5 tipos de vírus de alto risco e Gen-Probe APTIMA HPV Assay que deteta 14 HPV de alto risco. ^(80,109,115)

A PCR em tempo real também é usada na detecção do DNA viral do HPV. Recentemente, foi introduzido o Abbott RealTime High Risk HPV test (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) baseado na PCR em tempo real e concebido para detetar 14 tipos diferentes de HPV de alto risco. ⁽⁸¹⁾ Os poucos estudos efetuados revelaram que este é um teste com uma excelente especificidade analítica e sem qualquer reactividade cruzada, evitando, assim, a existência de falsos positivos. ⁽⁸¹⁾

6.4.3 Técnicas baseadas em Microarrays

Recentemente têm sido desenvolvidas novas técnicas de hibridação reversa que usam várias tecnologias, como por exemplo, microarrays. ^(25,80,101) Neste tipo de métodos, procede-se a uma amplificação por PCR de um fragmento do genoma viral e os produtos obtidos são desnaturados e submetidos a uma hibridação com sondas específicas ligadas à superfície de chips de DNA (microarrays). ^(25,80,101) A visualização é feita através do recurso a corantes fluorescentes.

O PapilloCheck HPV-Screening Test (PapilloCheck® Test Kit; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) é, atualmente, um dos testes mais usados a nível mundial, deste grupo. ^(25,80,101) Em Portugal é usado em alguns laboratórios, mas não há informação específica que nos permita saber se é, também, um dos mais usados. Este teste amplifica uma região do gene viral E1 e deteta e identifica 24 tipos diferentes do HPV, incluindo 18 genótipos de alto risco/provável alto risco (o fabricante não faz distinção) e 6 de baixo risco (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82). ^(25,43,45)

Os estudos que compararam este teste com outros tipos de teste (como a Captura Híbrida ou o Linear Array) apresentaram resultados muito semelhantes, o que indica que a reprodutibilidade e fiabilidade deste teste são semelhantes aos outros. ^(25,45,80) No entanto, a taxa de deteção dos HPV de alto risco é maior na Captura Híbrida, o que pode ser explicado pela possível reação cruzada deste teste com genótipos do vírus não incluídos no grupo de HPV de alto risco detetados pelos testes genéticos. ^(25,45,80) As vantagens que o PapilloCheck apresenta, relativamente ao Linear Array, prendem-se com o facto de ser menos dispendioso e ter uma fase maioritariamente automatizada o que elimina, em parte, os possíveis erros humanos. ^(25,45,80)

Um outro estudo desenvolvido em Portugal em que o PapilloCheck foi comparado com outros dois métodos de deteção moleculares (Seeplex HPV Genotyping e Digene HPV Genotyping RH test) mostrou diversas diferenças entre os resultados que, segundo a autora, poderá relacionar-se com o formato dos primers que é diferente entre os vários métodos e/ou com o tipo de deteção após a PCR. ⁽⁷⁷⁾ Estes factos, juntamente com a diferente especificidade que os vários métodos apresentam para detetar tipos específicos de HPV, ajudam a provar a discrepância que ainda existe entre os diversos métodos de deteção. ⁽⁷⁷⁾

Outro teste baseado nos microarrays é o CLART PAPILOMAVIRUS Humano 2 (Genomica, Madrid, Spain) que foi desenvolvido para a deteção e genotipagem de 35 tipos diferentes de HPV (20 de alto risco e 15 de baixo risco) em infeções simples ou múltiplas. ^(37,78) Esta metodologia utiliza primers específicos que amplificam um fragmento de 450 pb da região L1 do genoma viral do HPV. Esta sequência é altamente conservada, apresentando pequenas variações entre os diferentes tipos de HPV o que permite a sua identificação genómica por reconhecimento do DNA viral com sondas específicas. ^(37,78) Desta forma assegura-se a especificidade da deteção. Os 35 tipos de HPV detetados por este meio são o HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 e 89. ^(37,78) Um estudo desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA - Lisboa) que avaliou este método concluiu que o *CLART® PAPILOMAVIRUS*

Humano 2 apresenta uma excelente performance, sendo eficiente, sensível e reprodutível. ⁽⁷⁸⁾

7. Tratamento

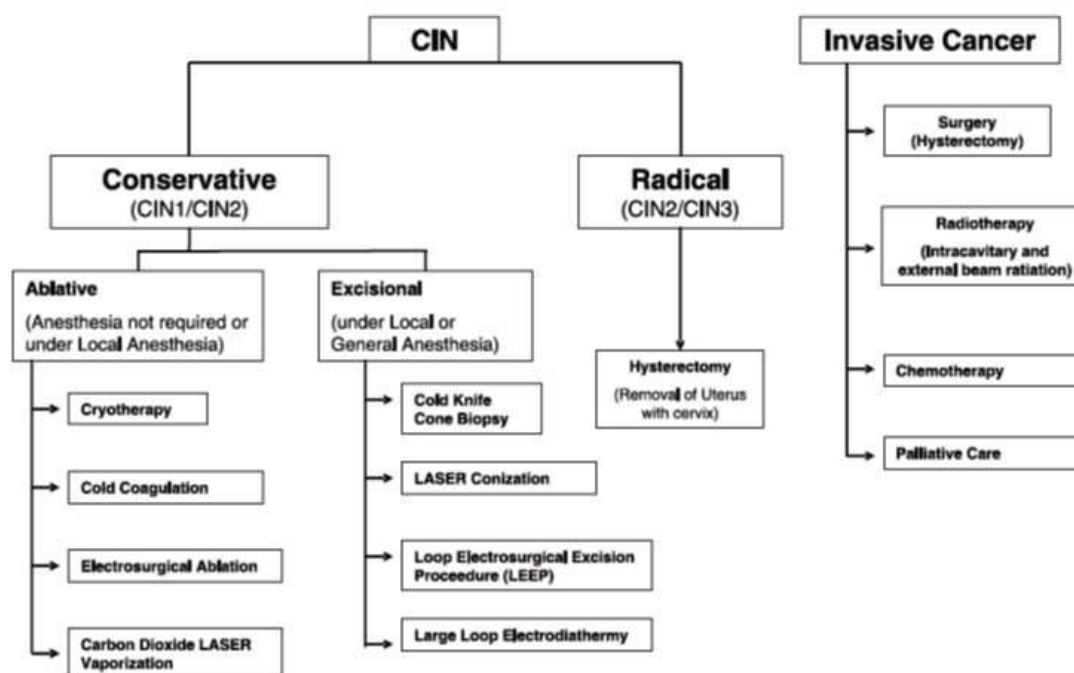
Todas as etapas do ciclo viral do HPV fornecem meios de interferir com cada uma delas podendo representar possíveis alvos contra os quais se podem desenvolver terapias anti-HPV. ⁽⁷⁾

7.1 Terapias em uso

7.1.1 Terapias convencionais

Normalmente, os primeiros tratamentos prescritos (Fig. 5) são com o intuito de eliminar a lesão e não o vírus. No entanto, estes tratamentos apenas são eficazes se a lesão for visível e pode não ser suficiente para eliminar a infecção. ^(7,39) Estudos efetuados concluíram que o risco de a infecção persistente permanecer e da lesão se tornar recorrente é muito elevado, até porque, na maioria das vezes, nenhum dos tratamentos tem sucesso nos três objetivos da terapia que são a completa erradicação das verrugas/lesões, evitar a reincidência das lesões e a eliminação do vírus. ^(7,39)

Fig. 5 – Exemplos de terapias convencionais para as lesões cervicais cancerosas e não-cancerosas. ⁽⁷⁾



Um desses tratamentos é a crioterapia (método destrutivo) que é usada no tratamento de lesões cervicais não cancerosas e consiste no congelamento da lesão cervical através da aplicação de óxido nítrico líquido ou dióxido de carbono líquido. É um método seguro, que requer pouca tecnologia, o que o torna bastante acessível, e é comumente escolhido para tratar lesões detetadas pelos rastreios. ^(17,36,75) No entanto tem algumas limitações que se prendem com a sua incapacidade para tratar lesões cancerosas e lesões pré-cancerosas de grande amplitude e com o facto de a sua profundidade não poder ser controlada o que pode fazer com que nem todas as células anormais sejam eliminadas. ^(17,36,75)

Outro exemplo é o recurso a um laser de dióxido de carbono (método destrutivo) que usa um pequeno feixe de luz para vaporizar as células anormais. O laser é direcionado através do colposcópio de modo a que o local de atuação seja controlado de forma precisa. ⁽⁷⁵⁾ Esta técnica é facilmente usada nos consultórios e não causa, praticamente, nenhum desconforto, levando, aparentemente, a uma cura mais rápida e com menos probabilidades de falha, sendo também mais fácil a monitorização da paciente. A principal desvantagem deste método é a necessidade de equipamento sofisticado o que o torna mais caro e, por isso, menos acessível. ⁽⁷⁵⁾

Uma outra opção, à qual se recorre, sobretudo, quando a lesão não é tão facilmente acessível ou não é tão pequena, corresponde a uma técnica cirúrgica denominada conização (método excisional), através da qual se deve extrair a pequena zona do colo uterino em forma de cone onde a lesão se evidencia, o que não prejudica, normalmente, o funcionamento do restante útero. ^(48,75) Esta técnica pode ser realizada com recurso a instrumentos cirúrgicos convencionais (*cold knife* ou *cold-cone*) ou usando um laser. É um método usado tanto para o diagnóstico como para o tratamento destas lesões, uma vez que após a remoção do tecido anormal este é enviado para análise. ^(48,75) O maior risco no uso desta técnica é a possibilidade de provocar graves hemorragias que requerem tratamento posterior. Há ainda a possibilidade, ainda que remota, deste método provocar o estreitamento do colo do útero o que pode causar infertilidade. ^(48,75)

No seguimento da conização surgiu outro método terapêutico com o mesmo objetivo, mais rápido e já mundialmente usado, o LEEP (*Loop*

electrosurgical excision procedure), que remove menor quantidade de tecido, está associado a menores taxas de hemorragias, dor e infecção e é tão eficaz como as técnicas cirúrgicas convencionais. Esta técnica utiliza um fio fino com um gancho através do qual flui energia elétrica para remover o tecido anormal. ^(75,91)

Nos casos mais graves e se a paciente não colocar obstáculo no facto de não poder vir a ter filhos no futuro, pode optar-se por uma técnica mais radical, a histerectomia, que consiste na remoção total do útero. ⁽⁷⁵⁾ É um importante procedimento cirúrgico e, sendo um dos métodos menos usados, é o que resolve mais facilmente o problema. O recurso a este método não evita, no entanto, que a paciente continue a ser vigiada porque a displasia pode passar para as zonas adjacentes. ⁽⁷⁵⁾ Conjuntamente com a histerectomia, em casos de cancro invasivo, podem ser usados tratamentos como radioterapia ou quimioterapia. ⁽⁷⁾

7.1.2 Terapias alternativas

Podem ser usados agentes citotóxicos, mas de forma limitada e se as lesões forem externas. Podem provocar uma grande reação inflamatória. Um exemplo destes agentes é a podofilina (*Podophyllin*) que destrói as verrugas através da indução de necrose no tecido local. ^(7,39) A maioria destes agentes mostra uma resposta antiviral inexistente ou inconsistente. Atualmente, estão, no entanto, a ser estudados dois agentes anticancerígenos (trióxido de arsénio (As_2O_3) e carboplatina) que parecem interagir com dois fatores de transcrição (AP-1 e NF- κ B) importantes na expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV. ^(7,39)

A terapia fotodinâmica (PDT) é um novo tratamento que pode ser usado em lesões neoplásicas associadas ao HPV. É uma das terapias mais aceites e com mais evidências de eficácia. ^(7,35) A resposta terapêutica à PDT é conseguida através da ativação de um fotossensibilizante não-tóxico adicionado ao tecido neoplásico, usando luz visível sintonizada na banda de absorção adequada ao fotossensibilizador. ^(7,35) Esta terapia, quando realizada na presença de oxigénio leva à produção de espécies reativas de oxigénio que resultam na fotooxidação local, destruindo as células tumorais e inativando o(s) vírus. Esta reação pode ativar o sistema imune do hospedeiro. É um procedimento não invasivo e provoca

escassos efeitos secundários. Não é, no entanto, eficaz em todos os tipos de lesões. ^(7,35)

Relativamente à imunoterapia, os Interferões (IFN) são uma droga antiviral aprovada para o tratamento de lesões benignas associadas ao HPV. Vários estudos demonstraram que terapias com base no uso do IFN- α são eficazes na redução da taxa de recorrência de condilomas, nos quais todas as lesões visíveis foram removidas cirurgicamente após a administração local de IFN- α . ^(7,55) Contudo, esta terapia tem uma eficácia limitada. Não houve, até hoje, estudos conclusivos quanto ao uso desta droga em lesões tumorais. Os resultados dos vários estudos, no que respeita à eficácia deste tratamento são muito discrepantes. ^(7,55) A razão destas discrepâncias não foi ainda determinada, mas pensa-se que poderá dever-se ao facto de os IFN não serem capazes de suprimirem a expressão do HPV de forma universal em todos os pacientes, uma vez que diversas variáveis, como o tipo de vírus que causa a infeção, o tipo de IFN ou mesmo a presença de mutações nas células anormais, poderão afetar o desempenho deste modo de tratamento. ^(7,55)

Dentro da imunoterapia, têm sido efetuados ensaios clínicos com outros compostos como os imunomoduladores, mais propriamente, as imidazoquinolonas. Esta substância induz a produção de citocinas inflamatórias de modo a potenciar resposta imune inata através da ação de macrófagos e células dentríticas. ^(7,39) Esta droga tem mostrado ser eficaz e segura no tratamento de lesões externas. Graças à sua utilização fácil e aos poucos efeitos secundários, estes compostos poderão vir a tornar-se uma boa opção para o tratamento deste tipo de infeções, quer isolados quer em conjunto com outras formas de tratamento. ^(7,39)

7.2 Novas terapias

Têm vindo a ser exploradas estratégias de tratamento diferentes que deverão interferir com a infeção por HPV em várias das suas fases: entrada do vírus na célula, período de latência, replicação viral e expressão oncológica. ⁽⁷⁾

7.2.1 Vacinas terapêuticas

O desenvolvimento da lesão inicial, a sua manutenção e a sua progressão para uma lesão cancerosa requer uma expressão intracelular contínua das oncoproteínas virais E6 e E7. Por este motivo, têm sido desenvolvidas vacinas terapêuticas para estimular diretamente a resposta das células T contra estes oncogenes virais precoces. ^(7,28,59,105) Têm sido testadas várias formas de vacinas cuja abordagem inclui vacinas baseadas em vetores, proteínas/peptídeos, ácidos nucleicos e a totalidade da célula. Este tipo de vacinação leva a uma resposta imunogénica variável e parece reduzir o grau das lesões, apesar de não produzir um impacto imediato. ^(7,28,59,105) O seu efeito na regressão/eliminação da lesão ou na presença/ausência do HPV foi, no entanto, determinado em poucos estudos, dos quais se concluiu que, apesar da imunidade anti-HPV ser efetiva, a regressão da lesão e a eliminação do vírus não foi observada em todos os pacientes. Esta é a principal razão para que este tipo de tratamento não tenha sido ainda implementado, sendo necessários mais estudos e outras abordagens. ^(7,28,59,105) Tem sido estudada a combinação entre estas vacinas e as vacinas preventivas, de modo a determinar se uma resposta imune mediada por células pode ser eliciada juntamente com a produção de anticorpos. Se isto acontecesse seria possível desenvolver um tipo de vacinas quiméricas com uma componente terapêutica que poderia ser usado de forma combinada tanto na profilaxia como no tratamento deste tipo de infeções. ^(7,28,105)

7.2.2 Terapias baseadas na interferência ao RNA

Na última década tem havido um grande desenvolvimento das terapias baseadas na interferência ao RNA, principalmente tendo como alvo os oncogenes E6 e E7 do HPV, sem prejuízo da pool de RNA das células normais, ao contrário das terapias convencionais. Pensa-se que tendo estes genes como alvo se possa chegar ao tratamento de lesões ativas associadas ao HPV. ⁽⁷⁾ A maioria dos estudos até agora efetuados foi desenvolvida em culturas celulares, havendo ainda muito poucos estudos efetuados em animais e nenhum em humanos. ⁽⁷⁶⁾ Serão necessários mais estudos para que esta forma de terapia possa ser testada e a sua eficácia ser comprovada. ⁽⁷⁶⁾

7.2.3 Terapias com recurso a derivados de ervas e outros produtos naturais

As falhas no desenvolvimento de vários tipos de drogas para uso no tratamento eficaz de infeções por HPV suscitaram a necessidade de se estudarem alternativas, como é o caso do recurso a produtos naturais que são, à partida, seguros e possuem capacidades para interferir com os oncogenes virais e inibir a desregulação da expressão genética das células hóspedes. ⁽⁷⁾ Nos últimos anos alguns destes produtos têm sido estudados como supressores dos fatores de transcrição da célula hospedeira infetada por HPV, estando, por isso, associados com a desregulação da expressão genética do vírus levando à apoptose das células infetadas. ⁽⁷⁾ Estes antivirais parecem ter o potencial de tratar, tanto infeções por HPV inaparentes, como lesões clínicas visíveis. Serão também uma estratégia de tratamento barata e aparentemente segura e eficaz, o que os torna um forte candidato a serem considerados uma forma de tratamento preferencial neste tipo de infeções. ⁽⁷⁾ Este tipo de tratamento está ainda em fase de estudo.

7.3 Terapias usadas em Portugal

Em Portugal não existe uma padronização dos tratamentos a usar. Apenas estão estabelecidas normas gerais para todas as doenças oncológicas. ^(22,26) A Sociedade Portuguesa de Ginecologia disponibiliza, no entanto, algumas orientações. Assim, a escolha do tratamento deve ser baseada na história natural das lesões, na segurança do diagnóstico citológico e histológico e na disponibilidade do seguimento. ⁽⁷²⁾ De acordo com um consenso emitido por esta entidade, para que se escolham os métodos destrutivos o estudo citológico não deve reportar células glandulares atípicas, a colposcopia não deve apresentar sinais que levem a suspeita de doença invasiva, não deve existir discrepância entre a citologia e/ou colposcopia e/ou biópsia, deve existir sempre um diagnóstico histológico (preferível mais do que uma biópsia) e quando existe a possibilidade de *follow-up*. ⁽⁷²⁾ Já os métodos excisionais devem ser escolhidos quando a idade das utentes é superior a 35 anos, quando há discordância entre a citologia/colposcopia/biópsia, aquando a presença de lesões extensas e/ou uma

lesão central, quando estamos na presença de doença recorrente ou com persistência superior a 2 anos e quando não há possibilidade de seguimento. ⁽⁷²⁾

As terapias alternativas não são, ainda, utilizadas em Portugal.

8. Prevenção

O controlo da infeção por HPV e, conseqüentemente, do cancro do cólo do útero deve traduzir-se em estratégias conjuntas que incluam ações de prevenção primária através de programas de educação sexual e reprodutiva e da vacinação, prevenção secundária através de programas de rastreio eficazes e prevenção terciária, tornando o recurso aos serviços de saúde (diagnóstico, tratamento e cuidados paliativos, se necessário) de fácil acesso. ⁽¹¹⁴⁾

8.1 Evitar comportamentos de risco

Uma forma de prevenir a infeção por HPV é evitar os comportamentos de risco. Uma campanha desenvolvida no Uganda nos finais da década de 80, com o objetivo de prevenir várias doenças sexualmente transmissíveis, tem sido usada ao longo do tempo e tem como lema ABC, *Abstain, Be faithful, use Condoms*. ⁽⁶⁾ Isto porque, a abstinência da atividade sexual previne os tipos de infeção transmitidos por via sexual. Devido à forte associação das infeções virais por HPV ao grande número de parceiros sexuais, ser fiel a um único parceiro pode prevenir o surgimento de doença, se o parceiro for também monogâmico. ⁽⁶⁾ O uso de preservativos não está claro que possa evitar a transmissão do vírus, mas está diretamente associado à prevenção de verrugas genitais e lesões cervicais. ⁽⁶⁾

8.2 Programas de Rastreio

Para além de ferramentas acessíveis, aceitáveis e eficazes, o bom desempenho de um programa de rastreio depende de alguns fatores, tais como o tipo de informação e formação das pessoas a que se destina e das respetivas comunidades, de modo a que estas participem nos programas. Após o rastreio são necessários programas de diagnóstico e tratamento eficazes e acessíveis para que as pessoas possam ser reencaminhadas e bem acompanhadas. ^(3,8)

Programas de rastreio organizado e tratamento precoce têm sido eficazes na prevenção de infeções cervicais por HPV nos países industrializados, tendo evoluído ao longo do tempo. A citologia convencional tem sido, com o tempo, substituída pela citologia líquida e a implementação de novos métodos de deteção também tem sido equacionada. ^(3,8) Estes programas são, no entanto, mais difíceis de implementar nos chamados países em desenvolvimento, devido à falta de infraestruturas (laboratórios, centros de rastreio e tratamento, equipamento), recursos humanos (profissionais de saúde) e recursos financeiros. ^(8,47,62) Nestes casos, as técnicas de inspeção visual a olho nu, tais como a VIA (*Visual Inspection with Acetic Acid*) e a VILI (*Visual Inspection with Lugol's Iodine*), têm sido mais facilmente adotadas. Estas técnicas são realizadas com recurso a uma boa fonte de luz que permite ver as áreas cervicais afetadas; estas identificam-se por apresentarem uma coloração esbranquiçada no caso da VIA ou uma coloração amarelada/alaranjada no caso da VILI. ^(8,61,62) As vantagens destas técnicas prendem-se com o facto de apresentarem uma resposta rápida, são pouco dispendiosos e requerem uma quantidade mínima de equipamento. No entanto, estas apresentam bastantes limitações porque são pouco específicas e dependem diretamente da existência de lesão, levando à existência de um risco aumentado de surgirem falsos positivos ou falsos negativos. ^(8,61,62) Assim torna-se necessária a implementação de testes simples, baratos e fiáveis nos programas de rastreio, de modo a torna-los efetivos e acessíveis a todos os países. ^(8,47,61,62) Uma possível solução mais reproduzível e objetiva será testar diretamente o DNA do HPV que é mais sensível na deteção de infeções por este vírus. Assim, o desenvolvimento de um teste rápido e acessível para detetar o DNA do HPV pode ser uma boa alternativa a este tipo de rastreio, sendo recomendado a sua combinação com os testes convencionais. Vários estudos demonstraram que o uso deste tipo de testes pode reduzir a ocorrência de lesões graves. ^(3,8,47,62) As vantagens de testar diretamente o DNA do HPV residem nos seguintes factos: a sua alta sensibilidade; o facto de identificar não só infeções ativas mas também o risco de infeção num período entre os 3 e os 10 anos seguintes, o que é importante, principalmente, nos países em desenvolvimento que não têm recursos para rastrear todas as pessoas num intervalo de 5 ou 10

anos; a interpretação dos resultados é clara e objetiva ao contrário dos rastreios com recurso a testes visuais. ^(8,61,62) As limitações da deteção do DNA do HPV são o custo elevado e a necessidade de infraestruturas e recursos humanos especializados. No entanto, para responder a estas limitações, foi desenvolvido um teste, *CareHPV* (Qiagen Gaithersburg Inc., MD, USA), simples, rápido e operacional para locais com poucos recursos que consegue reproduzir resultados em cerca de 3h. ^(8,61,62) Vários estudos já efetuados com este teste têm demonstrado bastante sensibilidade e especificidade, reduzindo a probabilidade de surgirem lesões graves e aumentando as possibilidades de um tratamento eficaz. Este teste representa uma alternativa promissora, num futuro próximo, aos programas de rastreio hoje desenvolvidos, no entanto, é necessário que se desenvolvam mais estudos que avaliem a sua eficácia. ^(8,61,62)

Hoje em dia entre o rastreio, o diagnóstico e o tratamento está envolvida uma estratégia que engloba três etapas: a avaliação inicial que poderá incluir o rastreio por inspeção visual e/ou a pesquisa do DNA viral do HPV, uma segunda etapa onde se procede a uma colposcopia nas pacientes que apresentaram resultados positivos na primeira visita, e o tratamento na terceira etapa, após a confirmação do diagnóstico através de uma biopsia. ^(36,61) Para evitar dificuldades no acompanhamento das pacientes e otimizar o seu atendimento tem sido considerada uma abordagem alternativa designada de *screen-and-treat* onde o encaminhamento e respetivo tratamento são de imediato disponibilizados às pacientes com rastreio positivo. Os tratamentos usados nesta alternativa são, normalmente, a crioterapia e o LEEP. ^(36,61) Um dos aspetos mais controversos em relação ao *screen-and-treat* é o facto de um grande número de pacientes sem lesões de alto grau, mas que apresentam resultados positivos no rastreio, serem submetidas ao tratamento. Existem, no entanto, poucos estudos que indiquem se existe algum malefício na realização de tratamento em pacientes sem lesão visível, pelo que é difícil de perceber se este poderá ser ou não um fator negativo desta abordagem. ⁽¹⁰⁸⁾

Em Portugal, o rastreio do cancro do cólo do útero, apesar de fortemente recomendado, é feito somente de forma oportunista, uma vez que apenas é realizado em consultório privado ou nos centros de saúde. ⁽¹¹⁴⁾ A Região Centro é

uma exceção dado que tem um rastreio de base populacional a funcionar nos centros de saúde desde há mais de 15 anos. Este rastreio foi inicialmente organizado pelo Instituto Português de Oncologia (IPO) do Centro, mas há 3 anos que está a ser coordenado pela Administração Regional de Saúde (ARS).⁽¹¹⁴⁾ Apesar da cobertura deste programa ao longo dos anos não ter sido homogénea ou consistentemente elevada, os valores de incidência de cancro do cólo do útero na zona centro são mais baixos que os da média do país, o que reforça a importância da implementação destes programas de rastreio noutras zonas do país.⁽¹¹⁴⁾ Os dados relativos à realidade nacional são insuficientes e inconsistentes, sendo difícil retirar conclusões seguras acerca das taxas de cobertura do rastreio.⁽¹¹⁴⁾ O Plano Oncológico Nacional para os anos 2007 a 2010 refere que a extensão da cobertura do rastreio a todo o país, bem como a sua avaliação e monitorização são objetivos importantes a alcançar.⁽²²⁾

O rastreio em Portugal inclui apenas a citologia cervical. O Plano Oncológico Nacional para os anos 2001 a 2005 que foi, posteriormente, revalidado em 2007 indica que “No rastreio de cancro do colo do útero, o teste a utilizar será a citologia cervical — teste de Papanicolaou — com convite ao grupo etário dos 30 aos 60 anos (extensivo a grupos etários vizinhos, consoante os recursos disponíveis) e intervalo de rastreio de três anos — após dois exames anuais negativos;”.⁽²⁶⁾ A genotipagem dos HPV, devido aos custos avultados, só é feita em casos selecionados, de acordo com a patologia existente.⁽¹¹⁴⁾ Os métodos utilizados para a deteção e genotipagem do vírus são variados, não havendo nenhum padrão uniformizado quer em laboratórios públicos quer em privados. É importante, no entanto, que, junto ao resultado, se indique o método utilizado, que painel de vírus está incluído e saber qual a sensibilidade e especificidade do método que se está a utilizar, uma vez que existem muitas diferenças entre os vários métodos em uso.⁽⁷²⁾

Segundo um consenso emitido este ano pela Sociedade Portuguesa de Ginecologia em conjunto com a Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal, o procedimento a adotar no seguimento da primeira citologia depende do resultado desta.⁽⁷²⁾ Assim, face a um resultado citológico considerado insatisfatório ou com alterações celulares reativas associadas a

inflamação, o esfregaço citológico deve ser repetido ao fim de 3 meses, sendo aconselhada a deteção do DNA viral e/ou a colposcopia caso este resultado se repita. ⁽⁷²⁾ No caso de a citologia ser classificada como ASCUS, a repetição da citologia aos 6 meses deve ser considerada, apenas, na falta de disponibilidade de colposcopia imediata. A deteção do genótipo do HPV deve, no entanto, ser a opção preferida, sempre que possível. Às utentes com ASC-H na citologia está indicada a realização imediata de colposcopia, não sendo aconselhado o teste de deteção do HPV, uma vez que a prevalência de lesões de CIN II nas mulheres com este diagnóstico citológico ronda os 50%. ⁽⁷²⁾ Sempre que os esfregaços citológicos apresentarem LSIL ou HSIL deve seguir-se, de imediato, uma colposcopia. Nestes casos está desaconselhada a repetição da citologia e do teste do HPV, dado que na maioria dos casos a deteção do HPV dá positiva. Nos casos em que se deteta a presença de células glandulares atípicas, o estudo diagnóstico inicial deve ser a colposcopia com estudo do endocolo e a deteção do DNA do HPV. ⁽⁷²⁾

8.3 Vacinação

A vacinação contra o HPV pode ser uma ferramenta importante na prevenção da infeção. A descoberta de que a proteína L1 – expressa em diversos sistemas como células eucarióticas humanas, leveduras e bactérias – é capaz de se organizar em partículas de estrutura icosaédrica, semelhantes ao capsídeo viral, VLP (*viral like particles*), mas sem o DNA do vírus, potenciou o desenvolvimento de vacinas profiláticas. ^(14,19,28) As vacinas são compostas por VLP das proteínas L1 que formam os pentâmeros do capsídeo e aumentam a produção de anticorpos neutralizantes do vírus no soro. A correta configuração das proteínas da cápside é necessária para a produção de anticorpos protetores. ^(11,19,28) Esta é a razão pela qual não podem ser usados monómeros de L1 em separado, uma vez que a desnaturação ou alguma alteração na estrutura da proteína modifica a apresentação dos epitopos e impede a formação deste tipo de anticorpos. Assim as vacinas profiláticas são específicas para os vários tipos de HPV apresentando, no entanto, alguma reactividade cruzada com outros genótipos similares. ^(19,28)

As VLP surgem espontaneamente em células que expressam proteínas L1 em quantidade suficiente, incluindo bactérias (ex.: *Escherichia coli*), leveduras (ex.: *Saccharomyces cerevisiae*) e vetores. ⁽¹⁹⁾ Esta capacidade das VLP também se verifica *in vitro*, o que permite a sua manipulação para remover contaminantes moleculares durante a fabricação. Outro fator positivo das VLP é o facto de estas serem destituídas de qualquer material genómico viral ou de qualquer outro DNA ou RNA e, como tal, não representam risco de infeção. ⁽¹⁹⁾ No entanto, a ausência de DNA pode ser uma limitação, uma vez que, ao contrário das vacinas baseadas em vírus vivos atenuados, esta não estimula o sistema imune de forma prolongada. Por este motivo às VLP são adicionados adjuvantes que têm como função potenciar a resposta inicial. ⁽¹⁹⁾

A vacinação por injeção intramuscular de VLP de L1 tem demonstrado ser muito imunogénica, aumentando a proliferação de células T e a produção de citocinas, e parece ser bem tolerada. ^(11,28) Vários estudos mostraram uma proteção quase completa contra as infeções persistentes dos tipos de HPV alvo, confirmaram a segurança das vacinas e ainda uma resposta imunogénica bem mais forte do que as respostas naturais do sistema imune. ^(11,28)

O acompanhamento após a administração das vacinas indica que o título de anticorpos atinge inicialmente valores altos e que depois cai, estabilizando, ainda assim, a um nível superior ao observado nas infeções naturais e mantendo-se em níveis protetores por muitos anos. ⁽¹⁹⁾ O que ainda não é conhecido é o período de tempo que o título de anticorpos leva para descer a um nível abaixo do limiar necessário para prevenir novas infeções, se a exposição natural subsequente pode promover uma resposta imunitária rápida suficiente para prevenir novas infeções e se serão necessários reforços periódicos numa escala a determinar pela cuidadosa monitorização de populações vacinadas. ⁽¹⁹⁾

Estão em uso 2 vacinas deste tipo: a vacina tetravalente *Gardasil* (*Merck & Co., Inc.*) que oferece proteção contra os HPV 16, 18, 6 e 11, e a vacina bivalente *Cervarix* (*GlaxoSmithKline Biologicals*) que protege apenas contra os tipos 16 e 18. Ambas as vacinas, quando administradas em pessoas sem infeção, oferecem uma eficácia acima dos 90% na imunização e prevenção da infeção por este tipo de vírus. ^(4,11,28,62) A vacinação é recomendada a jovens entre os 11 e os 12 anos

para que sejam vacinadas antes da primeira experiência sexual, mas também a mulheres entre os 13 e os 26 anos que ainda não tenham sido vacinadas. ^(4,11,28) As duas vacinas têm demonstrado ser seguras. Nenhuma delas mostrou indícios de tratar ou proteger contra a doença em pessoas já infectadas com o vírus. ^(4,11,28,114) Foi verificada uma proteção cruzada modesta contra tipos de vírus relacionados com os HPV 16 e 18 na vacina bivalente. ^(4,11,28,114) Para ambas as vacinas está recomendado um esquema vacinal de 3 doses por via intramuscular, aos 0, 1 ou 2 e 6 meses, de modo a induzir títulos elevados de anticorpos contra o vírus. ^(19,114) Para nenhuma delas está, atualmente, estabelecida a necessidade de reforços. Nenhuma das vacinas existentes confere proteção contra todos os HPV oncogénicos, pelo que a continuidade dos rastreios é fundamental. ⁽¹¹⁴⁾

Em Portugal, a vacina tetravalente *Gardasil* é comercializada desde 2006, enquanto a bivalente *Cervarix* começou a ser comercializada em 2007, ano em que o governo decidiu incluir a vacina contra o HPV no Plano Nacional de Vacinação. ⁽¹¹⁴⁾ A vacina escolhida para administrar foi a tetravalente *Gardasil*. ⁽³⁸⁾ A estratégia assumida foi proposta pela Comissão Técnica de Vacinação e consistia em administrar a vacina a raparigas com 13 anos de idade, com início em 2008, para as raparigas nascidas em 1995, realizar uma campanha de repescagem, entre 2009 e 2011, com vacinação do grupo de raparigas que completam os 17 anos no ano da campanha (nascidas em 1992, 1993 e 1994) e a partir de 2012, passar a vacinar apenas um grupo por ano. ^(16,114) A vantagem desta estratégia mista e mais abrangente resulta da vacinação, num curto espaço de tempo, dos grupos que apresentam maior risco de infeção por HPV e que mais beneficiam com a vacinação. ^(16,114) Nas recomendações das autoridades de saúde pública sobre a vacinação em massa o binómio custo-efetividade tem um peso decisivo, bem como os recursos disponíveis para programas de vacinação, daí a prioridade ser dada a jovens que, supostamente, não tenham sido expostas ao vírus. ^(16,114) Os estudos epidemiológicos documentam que o risco de infeção é significativo até aos 50 anos, pelo que as mulheres sexualmente ativas, independentemente da idade, têm benefícios potenciais com a vacinação, que devem ser ponderados numa perspetiva individual. ^(16,114) Os resultados dos trabalhos efetuados mostram a eficácia e segurança da *Gardasil* em mulheres até

aos 45 anos enquanto a vacina bivalente *Cervarix* é segura e imunogénica em mulheres até aos 55 anos. Ambas estão disponíveis nas farmácias para serem comercializadas mediante receita médica, embora não tendo, por enquanto, qualquer comparticipação do estado. ^(16,114)

Capítulo II – Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo avaliar se os métodos moleculares de detecção do HPV podem substituir a técnica citológica no rastreio de primeira linha da infecção por HPV. Para tal fez-se a comparação entre os resultados obtidos pela técnica citológica e pela pesquisa do DNA viral do HPV e respetiva genotipagem, pelo método PapilloCheck® Test Kit. Foram utilizados os resultados de 994 amostras obtidas a partir de citologias em meio líquido. Esta comparação consistiu em alguns pontos essenciais:

- Verificação da concordância entre os resultados da genotipagem e da citologia;
- Verificação da prevalência dos vários resultados da citologia aquando a presença/ausência de HPV;
- Verificação da prevalência de lesão intraepitelial em casos de infecção múltipla por HPV;
- Avaliação da importância da detecção do HPV por métodos moleculares, em particular do método estudado, como complemento ou substituto da técnica citológica.

Capítulo III – Material e Métodos

1. Amostras

Neste estudo foram utilizadas 994 amostras de indivíduos do sexo feminino, obtidas a partir de citologias em meio líquido que deram entrada no laboratório de Anatomia Patológica Microdiag entre Fevereiro de 2009 e Janeiro de 2011, provenientes de várias consultas de ginecologia e planeamento familiar de todo o país. Estas amostras foram submetidas a técnicas citológicas e à pesquisa do DNA do HPV. Das 994 amostras em apenas 28 foi também executada a técnica histológica. As técnicas citológicas e histológicas foram efetuadas no laboratório de Anatomia Patológica Microdiag. A pesquisa do DNA viral foi efetuada no Grupo Beatriz Godinho, em acordo com o laboratório Microdiag, pelo método PapilloCheck® Test Kit. Este teste é, atualmente, um dos testes mais usados a nível mundial, dos métodos baseados no uso de microarrays.^(25,80,101) Em Portugal é usado em alguns laboratórios, mas não há informação específica que nos permita saber se é, também, um dos mais usados. A secção de Biologia Molecular do Laboratório Beatriz Godinho escolheu este método devido ao facto de detetar os genótipos clinicamente relevantes, à facilidade de execução e interpretação automática, à tecnologia de microarrays que contém controlos internos que dão confiança aos resultados e à sua relação qualidade/preço.

Em alguns casos, devidamente identificados, as respetivas técnicas foram repetidas em amostras recolhidas posteriormente. Estas repetições foram efetuadas sempre que o técnico ou clínico responsável achou necessário.

2. Métodos

2.1 Técnica citológica com recurso ao sistema automatizado Thin-Prep

O Thin-Prep é um sistema automatizado de preparação das lâminas de amostras citológicas colhidas pelo método da citologia líquida.⁽⁵⁰⁾ Assim, após a receção e identificação das amostras, o processo consiste numa tecnologia computadorizada com recurso a membranas que controlam a dispersão do muco e

restos celulares através de uma centrifugação, a recolha das células através da sua agitação, e a transferência das células para a lâmina, através de um sistema de sucção que permite uma distribuição regular na lâmina, com uma concentração média de 400000 células. ⁽⁵⁰⁾ Esta lâmina é, posteriormente, colocada num banho fixador para a perfeita fixação das células na mesma, ficando pronta para a coloração e visualização. ⁽⁵⁰⁾ Para a coloração são utilizados 3 corantes que constituem a Coloração Papanicolau: Hematoxilina, Orange G e EA50. De seguida procede-se à visualização. Os resultados obtidos são classificados de acordo com o Sistema de Bethesda.

2.2 Técnica histológica

Para a técnica histológica foi utilizado um protocolo baseado nos passos próprios para este tipo de técnica tais como a fixação (formol, álcool etílico a 96%, álcool etílico absoluto e xilol), desidratação (parafina), inclusão, corte, colagem, coloração, montagem e observação.

2.3 Pesquisa do DNA do HPV pelo método PapilloCheck® Test Kit

O PapilloCheck® Test Kit foi usado de acordo com as instruções do fabricante (PapilloCheck; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). O PapilloCheck® Test Kit é usado para a deteção qualitativa e diferenciação de 24 tipos de HPV (Fig.6) em preparações de DNA de esfregaços cervicais. ⁽⁴³⁾

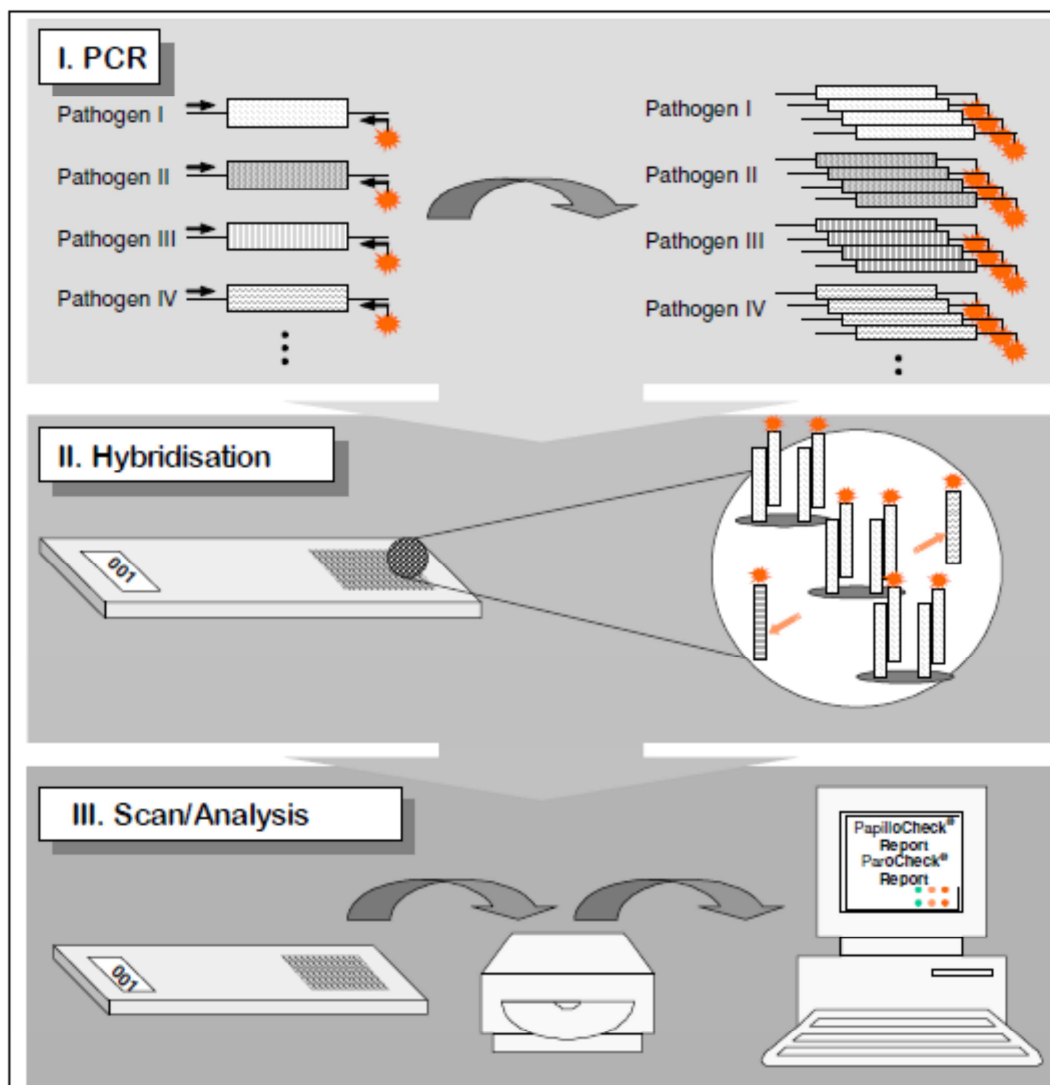
Fig. 6 – Tipos de HPV detectados pelo PapilloCheck® Test Kit. ⁽⁴³⁾

<i>HPV6</i>	<i>HPV35</i>	<i>HPV45</i>	<i>HPV59</i>
<i>HPV11</i>	<i>HPV39</i>	<i>HPV51</i>	<i>HPV66</i>
<i>HPV16</i>	<i>HPV40</i>	<i>HPV52</i>	<i>HPV68</i>
<i>HPV18</i>	<i>HPV42</i>	<i>HPV53</i>	<i>HPV70</i>
<i>HPV31</i>	<i>HPV43</i>	<i>HPV56</i>	<i>HPV73</i>
<i>HPV33</i>	<i>HPV44/HPV55*</i>	<i>HPV58</i>	<i>HPV82</i>

* Através deste método a diferenciação entre os HPV 44 e 55 não é possível, pelo que as amostras que apresentarem positividade para esta sonda podem conter ou o HPV 44 ou o 55. ⁽⁴³⁾

Este teste consiste (Fig.7) na amplificação por PCR de um fragmento do genoma viral (gene E1) e os produtos obtidos são desnaturados e submetidos a uma hibridação com sondas específicas ligadas à superfície de chips de DNA (microarrays).⁽⁴³⁾

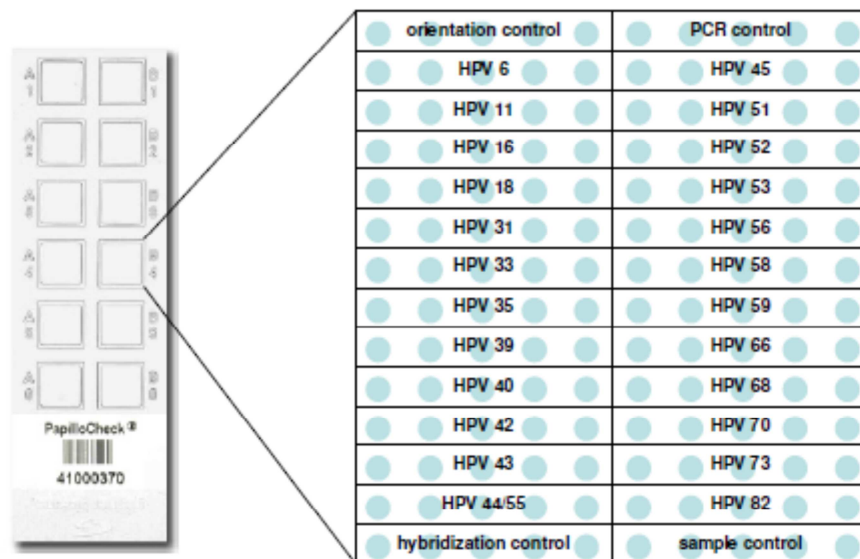
Fig. 7 – Princípio resumido do PapilloCheck® Test Kit.⁽⁴³⁾



- Após a extração do DNA, um fragmento de cerca de 350 nucleótidos do gene E1 do HPV e um fragmento do gene humano ADAT1 são amplificados na presença de primers específicos. A PCR resulta na produção de fragmentos de DNA com uma cadeia.
- Os produtos de amplificação são então hibridizados com sondas de DNA complementar no chip. Cada tipo de HPV é detectado por uma sonda de DNA específica presente nos 5 pontos de replicação de cada chip. Durante os passos de lavagem que se seguem os produtos inespecíficos ou em excesso são eliminados. O marcador de fluorescência é introduzido durante a PCR e o passo da hibridação.
- A luz fluorescente emitida pelos produtos ligados e marcados é detectada após a excitação com luz monocromática. A análise dos resultados é então realizada usando o software fornecido pelo fabricante, o CheckReport™ Software.⁽⁴³⁾

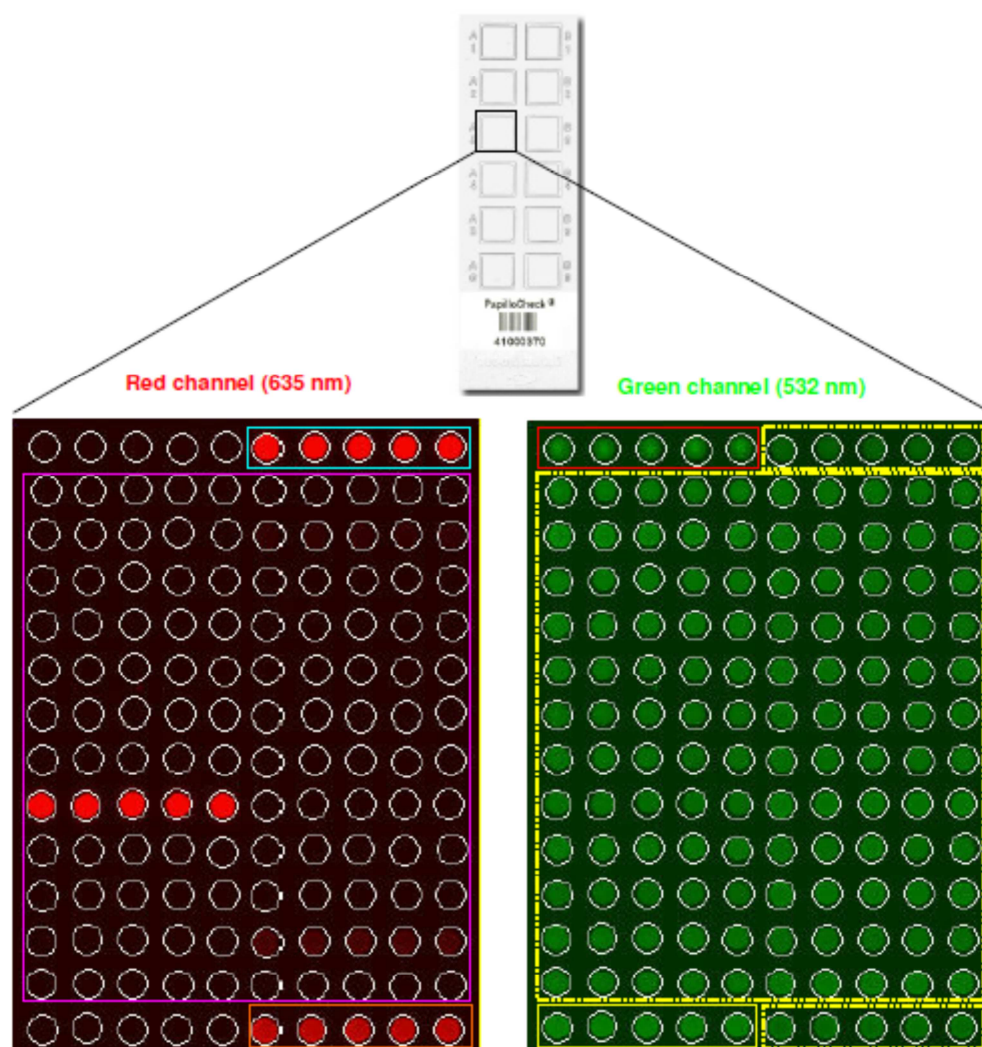
Estes chips (Fig.8) são constituídos por 12 poços (A1 – B6) e cada um destes poços contém um PapilloCheck® microarrays com 28 sondas, sendo que cada uma das sondas reconhece 5 pontos diferentes durante a replicação. ⁽⁴³⁾

Fig. 8 – *Layout* de um chip. ⁽⁴³⁾



Cada chip é submetido à excitação a dois comprimentos de onda diferente: 532 nm (verde) e 635 nm (vermelho) (Fig.9). ⁽⁴³⁾ Os sinais do chip no comprimento de onda 532 nm dão-nos o *printing control* que nos assegura a presença e homogeneidade de todos os 5 pontos de medida do DNA em cada uma das sondas, o *hybridization control* que nos permite perceber a performance da reação de hibridação, e o *orientation control* que nos dá a orientação da grelha de análise. ⁽⁴³⁾ Já os sinais do chip no comprimento de onda 635 nm dão-nos o *sample control* que nos indica o sucesso da extração do DNA e a qualidade dos templates usados na PCR, o *PCR control* que nos permite perceber a qualidade da amplificação durante a PCR, e os resultados propriamente ditos que nos indicam a presença ou ausência de DNA viral do HPV. ⁽⁴³⁾

Fig. 9 – Chip após ter sido submetido à excitação a 532 nm (verde) e a 635 nm (vermelho).⁽⁴³⁾



2.3.1 Extração de DNA

Este passo (Tabela 4) foi executado de acordo com as instruções do fabricante do PapilloCheck® DNA Extraction Kit (PapilloCheck; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Todos os reagentes utilizados vêm incluídos no kit, no entanto, é necessário proceder à sua preparação.⁽⁴²⁾

Tabela 4 – Passos a efetuar para a extração do DNA.⁽⁴²⁾

Preparação da amostra	- 250 µl de amostra em microtubos
-----------------------	-----------------------------------

Preparação da Master Mix para a Pré-lise	<ul style="list-style-type: none"> - 80 µl de L1 + 2,4 µl de Carrier RNA + 20 µl de Proteinase K. - Vortex ligeiro - 40 minutos a 56°C - Centrifugação ligeira
Lise	<ul style="list-style-type: none"> - 250 µl de L4 - Vortex - 15 minutos a 70°C - Centrifugação ligeira
Ajustar condições do DNA	- 300 µl de etanol
Ligação do DNA à membrana da coluna	<p>Preparar as colunas (incluídas no kit):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 450 µl de lisado - Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g - Restante lisado - Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g
Lavagem da membrana da coluna	<ul style="list-style-type: none"> - 500 µl de W1 - Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g - 600 µl de W2 - Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g
Secagem da membrana da coluna	- Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g
Eluir o DNA	<ul style="list-style-type: none"> - 100 µl de Buffer E pré-aquecido a 70°C - 1 minuto à temperatura ambiente - Centrifugação durante 1 minuto a 11000 g

2.3.2 Preparação da Uracil-N-DNA Glicosilase

Este reagente é utilizado com o objetivo de evitar possíveis contaminações. A sua preparação consiste na diluição em água numa proporção de 1:200. ⁽⁴³⁾

2.3.3 PCR

Com a exceção da HotStar Taq Polimerase, todos os reagentes necessários a este passo vêm incluídos no kit. Para cada reação são necessários os componentes apresentados na Tabela 5. ⁽⁴³⁾

Tabela 5 – Componentes necessários à reação de PCR. ⁽⁴³⁾

	Para 1 reação	Para 13 reações (1 chip)
PapilloCheck® Master Mix	19,8 µl	257,4 µl
HotStar Taq DNA polimerase	0,2 µl	2,6 µl
Uracil-N-DNA Glicosilase	1 µl	13 µl
Volume total antes da adição de amostra	21 µl	273 µl
DNA da amostra	5 µl	5 µl x 13 amostras
Volume total por reação	26 µl	26 µl x 13 amostras

Após a preparação das reações procede-se à PCR propriamente dita de acordo com os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Programa do termociclador do PapilloCheck® Test Kit. ⁽⁴³⁾

Tempo	Temperatura (°C)	Número de ciclos
20 minutos	37°C	1
15 minutos	95°C	1
30 segundos	95°C	40
25 segundos	55°C	
45 segundos	72°C	

30 segundos	95°C	15
45 segundos	72°C	
Fase final	4°C	

2.3.4 Hibridação e lavagem

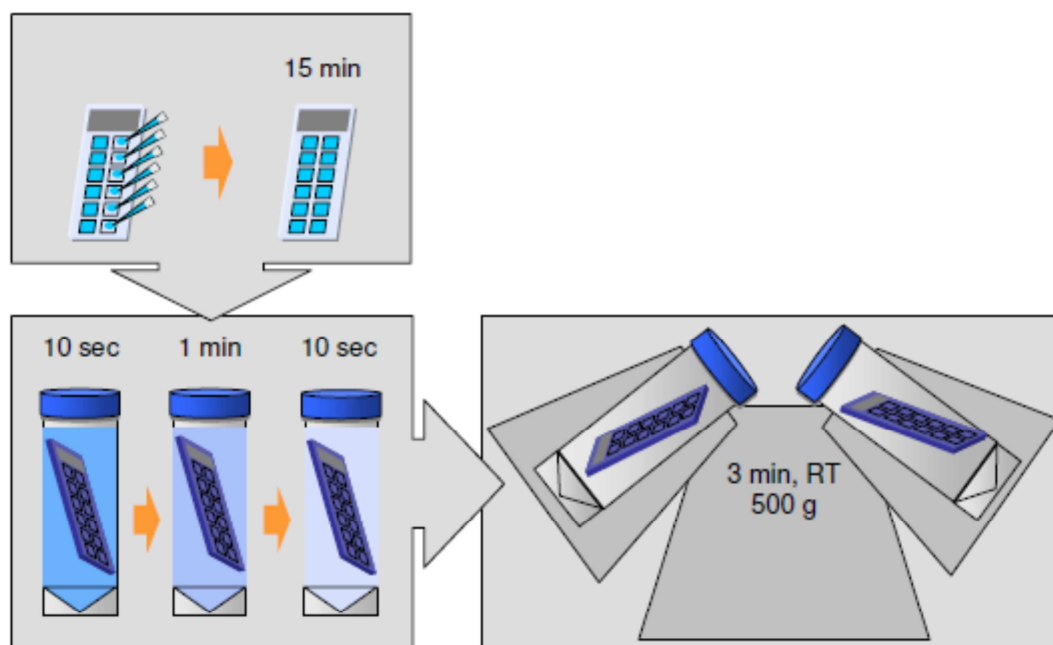
Os passos necessários a esta etapa estão sumarizados na Tabela 7 e na figura 10. Todos os reagentes utilizados vêm incluídos no kit, no entanto, é necessário proceder à sua preparação. ⁽⁴³⁾

Tabela 7 – Passos da hibridação e lavagem. ⁽⁴³⁾

Hibridação	Transferir 25µl do Mix da hibridação (previamente preparado) em cada compartimento do chip.
	Incubar o chip à temperatura ambiente durante 15 minutos numa atmosfera húmida.
Lavagem	Agitar o chip de forma vigorosa na solução de lavagem 1 (previamente preparada) durante 10 segundos, à temperatura ambiente.
	Agitar o chip de forma vigorosa na solução de lavagem 2 (previamente preparada) durante 60 segundos, a 50°C.
	Agitar o chip de forma vigorosa na solução de lavagem 3 (previamente preparada) durante 10 segundos, à temperatura ambiente.
	Secar o chip de modo a que não haja qualquer resíduo das soluções de lavagem, através de centrifugação

	curta na microcentrífuga.
--	---------------------------

Fig. 10 – Esquema dos passos efectuados na Hibridação e Lavagem do chip. ⁽⁴³⁾



2.3.5 Leitura do chip e análise dos resultados

A leitura e análise dos dados são efectuadas com o auxílio de um aparelho de leitura, o Greiner Bio-One CheckScanner™, que está ligado a um computador através de um programa, o CheckReport™ Software, que apresenta os resultados com uma imagem do chip semelhante à apresentada na Fig.9 e uma tabela como a apresentada na Fig.11. ⁽⁴³⁾

Fig. 11 – Demonstração dos resultados. ⁽⁴³⁾

Image Report	
Avaliação PapilloCheck	
Informações sobre a amostra:	
Número do Chip:	41023291
Poço:	A1
Sample ID:	a1
Tipo de HPV	Resultado
HPV16	positivo
HPV18	negativo
HPV45	negativo
HPV31	negativo
HPV33	negativo
HPV52	negativo
HPV58	negativo
HPV35	negativo
HPV59	negativo
HPV56	negativo
HPV51	negativo
HPV39	negativo
HPV68	negativo
HPV73	negativo
HPV82	negativo
HPV53	negativo
HPV66	negativo
HPV70	negativo
HPV6	negativo

Capítulo IV – Resultados

Neste estudo foram utilizadas 994 amostras de indivíduos do sexo feminino, que correspondem a mulheres com idades compreendidas entre os 18 e os 76 anos. As amostras cuja pesquisa do DNA viral deu positiva correspondem a mulheres com idades compreendidas entre os 19 e os 67 anos. Estes intervalos foram obtidos de acordo com os dados disponibilizados, uma vez que não são conhecidas as idades de todas as mulheres (Tabelas 8 e 9 e Fig.12).

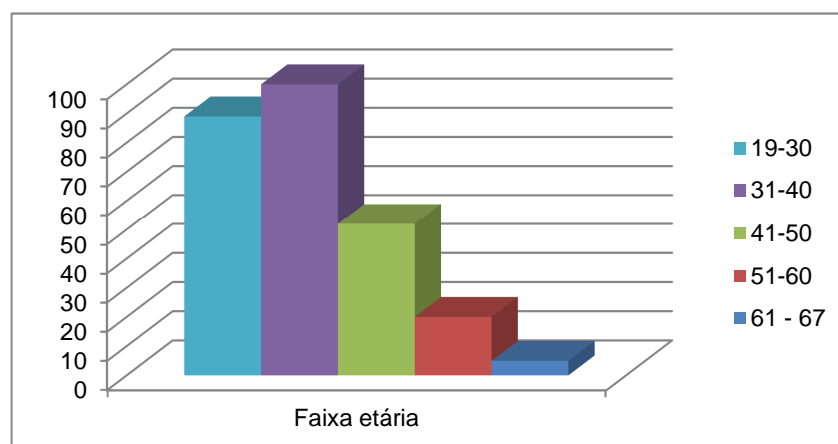
Tabela 8 – Intervalo das idades.

Intervalo das Idades – total das amostras	Intervalo das idades – amostras com HPV positivo
Idade mínima: 18	Idade mínima: 19
Idade máxima: 76	Idade máxima: 67
Média: 39,39	Média: 35,92

Tabela 9 – HPV positivo por faixa etária.

HPV positivo por faixa etária	
Faixa etária	Nº de casos positivos
19 - 30	89 (33,08%)
31 - 40	103 (38,28%)
41 - 50	52 (19,33%)
51 - 60	20 (7,43%)
61 - 67	5 (1,86%)

Fig. 12 - HPV positivo por faixa etária.

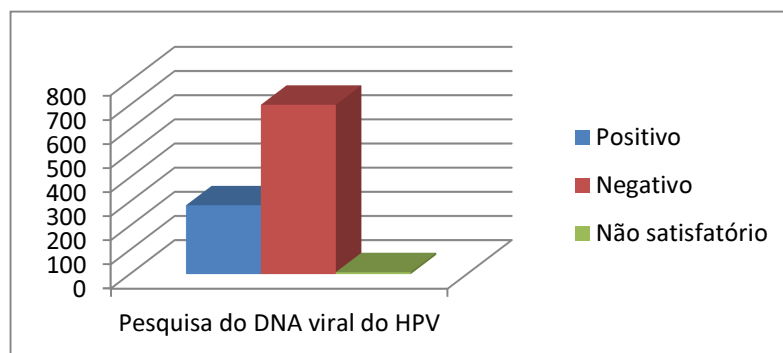


Relativamente à pesquisa do DNA viral do HPV, das 994 amostras, 701 apresentaram resultado negativo, 285 apresentaram resultado positivo e 8 amostras apresentaram resultado não satisfatório (Tabela 10 e Fig.13).

Tabela 10 – Resultados da pesquisa do DNA viral do HPV.

Pesquisa do DNA viral do HPV		
Positivo	Negativo	Não satisfatório
285 (28,67%)	701 (70,52%)	8 (0,80%)

Fig. 13 - Resultados da pesquisa do DNA viral do HPV.

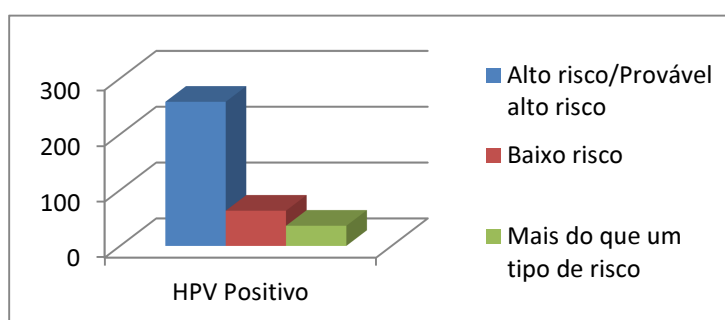


Dos resultados positivos e de acordo com a classificação do vírus quanto ao seu risco, 258 amostras (90,53%) apresentaram HPV de alto risco/provável alto risco e 63 apresentaram HPV de baixo risco (22,11%). De entre todas estas amostras, 36 apresentaram HPV de mais do que um tipo de risco (12,63%) (Tabela 11 e Fig.14). Isto é, 36 amostras apresentavam ao mesmo tempo HPV de alto risco/provável alto risco e HPV de baixo risco. Os valores apresentados para a prevalência de cada um dos tipos de risco incluem essas 36 amostras ($258 + 63 = 321 - 36 = 285$).

Tabela 11 – Tipos de vírus detetados nas amostras positivas para o HPV, quanto ao risco.

HPV Positivo		
Alto Risco/Provável alto risco	Baixo Risco	Mais do que um tipo de risco
258 (90,53%)	63 (22,11%)	36 (12,63%)

Fig. 14 - Tipos de vírus detetados nas amostras positivas para o HPV, quanto ao risco.



Das 258 amostras que apresentaram HPV de alto risco/provável alto risco, o vírus mais frequente foi o HPV16, seguido do HPV31, HPV51 e HPV56 (Tabela 12).

Tabela 12 – HPV de alto risco detetados nas amostras positivas para o HPV.

HPV Positivo de alto risco/provável alto risco									
Tipo de HPV	53	56	58	59	66	68	70	73	82
Quantidade	29	36	27	15	18	23	7	7	9
%	11,20%	13,90%	10,42%	5,79%	6,95%	8,88%	2,70%	2,70%	3,47%
Tipo de HPV	16	18	31	33	35	39	45	51	52
Quantidade	54	10	43	13	8	19	7	37	17
%	20,85%	3,86%	16,60%	5,02%	3,09%	7,34%	2,70%	14,29%	6,56%

Das 63 amostras que apresentaram HPV de baixo risco, o vírus mais frequente foi o HPV42 (Tabela 13).

Tabela 13 – HPV de baixo risco detetados nas amostras positivas para o HPV.

Tipo de HPV	HPV Positivo de baixo risco					
	6	11	40	42	43	44/55
Quantidade	9	4	5	32	11	12
%	14,29%	6,35%	7,94%	50,79%	17,46%	19,05%

Os resultados das citologias realizadas às amostras com resultado de pesquisa do DNA viral negativo e positivo estão apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 – Resultado das citologias das amostras com resultado negativo e positivo para o HPV.

Resultado das Citologias das amostras	HPV negativo	HPV positivo	HPV positivo de alto risco/provável alto risco	HPV positivo de baixo risco
Normal	385 (54,92%)	79 (27,72%)	70 (27,13%)	13 (20,63%)
<i>Candida spp</i>	18 (2,57%)	2 (0,70%)	1 (0,39%)	1 (1,59%)
Inflamação	185 (26,39%)	49 (17,19%)	46 (17,82%)	8 (12,70%)
DIU	4 (0,57%)	3 (1,05%)	2 (0,78%)	1 (1,59%)
Atrofia	25 (3,57%)	2 (0,70%)	2 (0,78%)	0
ASCUS	61 (8,70%)	51 (17,89%)	48 (18,60%)	14 (22,22%)
ASC-H	1 (0,14%)	4 (1,40%)	4 (1,55%)	1 (1,59%)
LSIL	9 (1,28%)	71 (24,91%)	61 (23,64%)	22 (34,92%)
HSIL	1 (0,14%)	18 (6,32%)	18 (6,98%)	1 (1,59%)
Carcinoma espinho-celular	0	1 (0,35%)	1 (0,39%)	0
Não satisfatória	12 (1,71%)	5 (1,75%)	5 (1,94%)	2 (3,17%)

Tabela 15 – Resultado das citologias das amostras com HPV positivo de acordo com o tipo de risco e com a presença ou não de infecções múltiplas.

Resultado das Citologias das amostras	HPV positivo com vírus de mais do que um tipo de risco	HPV positivo com mais de um vírus, independentemente do tipo de risco	HPV positivo só com um vírus, independentemente do tipo de risco
Normal	3 (8,33%)	15 (14,42%)	63 (35,20%)
<i>Candida spp</i>	0	0	2 (1,12%)
Inflamação	6 (16,66%)	15 (14,42%)	33 (18,44%)
DIU	0	0	3 (1,68%)
Atrofia	0	1 (0,96%)	1 (0,55%)
ASCUS	11 (30,55%)	24 (23,08%)	27 (15,08%)
ASC-H	1 (2,77%)	2 (1,92%)	2 (1,12%)
LSIL	12 (33,33%)	37 (35,58%)	34 (18,99%)
HSIL	1 (2,77%)	8 (7,69%)	10 (5,59%)
Carcinoma espinho-celular	0	0	1 (0,55%)
Não satisfatória	2 (5,55%)	2 (1,92%)	3 (1,68%)

Das 994 amostras apenas 28 foram submetidas à técnica histológica, de acordo com os pedidos médicos. Os resultados das biópsias realizadas nas amostras com HPV negativo e positivo estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultado das biópsias das amostras com HPV negativo e positivo.

Resultado das Biópsias das amostras	HPV negativo	HPV positivo
Sem alterações compatíveis com infecção por HPV	6	8
Alterações compatíveis com infecção por HPV	3	3
Alterações compatíveis com CIN I e infecção por HPV	0	3

Alterações compatíveis com CIN I/II e infecção por HPV	0	1
Alterações compatíveis com CIN II e infecção por HPV	0	1
Alterações compatíveis com CIN II e III	0	1
Lesão compatível com condiloma	0	1
Inconclusiva	0	1

Foram efetuadas repetições em amostras de 15 utentes. Os respetivos resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados das repetições efetuadas em amostras diferentes de 15 utentes.

Repetições				
Nº da repetição	HPV 1º resultado	Citologia 1º resultado	HPV 2º resultado	Citologia 2º resultado
1*****	42	LSIL	33,53,70	LSIL
2****	Negativo	Normal	Negativo	Normal
3*****	45	Normal	Negativo	ASCUS
4***	Negativo	Inflamação	Negativo	ASCUS
5*****	33,51	ASCUS	Negativo	Normal
6*****	Negativo	Atrofia	Negativo	Inflamação
7****	16,18	LSIL	Negativo	Normal
8*	31	Normal	31	LSIL
9****	51	Inflamação	51	Atrofia
10*****	39	Normal	Negativo	Normal
11*****	31,42	ASCUS	42	ASCUS
12****	Negativo	Normal	Negativo	Normal
13****	16	Normal	59,53	ASCUS
14**	Negativo	Normal	Negativo	Normal
15*	Negativo	ASCUS	Negativo	Inflamação

* Amostras com um mês de diferença

** Amostras com três meses de diferença.

***Amostras com quatro meses de diferença.

****Amostras com seis meses a um ano de diferença.

*****Amostras com um ano ou mais de diferença.

Capítulo V – Discussão

O vírus HPV apresenta um alto grau de tropismo celular específico para as células do epitélio escamoso, tendo sido associado a vários tipos de manifestações clínicas que vão desde lesões epiteliais hiperplásicas proliferativas, como verrugas, até ao cancro invasivo. ^(34,96) Vários estudos confirmaram a presença do DNA do HPV em quase 100% dos epitélios dos carcinomas invasivos, levando à tese mundialmente aceite de que a infeção pelo vírus HPV é “causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do cancro do cólo do útero”, uma vez que, virtualmente, somente uma fração de mulheres portadoras do vírus a desenvolve. ^(66,96,105) Assim, estima-se que cerca de 75% da população sexualmente ativa entre em contacto com um ou mais tipos de HPV durante a sua vida. A grande maioria destas infeções é, no entanto, eliminada pelo sistema imune e não desenvolvem sintomas no hospedeiro. ⁽⁹⁰⁾

Os resultados obtidos neste estudo pela técnica citológica e pelo método molecular são, de modo geral, concordantes. Há ainda, no entanto, casos que colocam em dúvida a eficácia total de ambos os métodos, pelo que dificilmente se pode considerar cada um dos métodos como suficiente por si só. A principal conclusão deste trabalho é que ambos os métodos são fiáveis, sendo, no entanto, aconselhável o seu uso em conjunto e não em separado. Assim, as técnicas moleculares não são suficientemente eficazes para substituir as técnicas citológicas nos rastreios de primeira linha, devendo, contudo, ser usadas para as complementar. Neste trabalho concluiu-se também que mulheres de todas as idades correm o risco de contrair o vírus. De todas as amostras cerca de 28% apresentou HPV positivo, sendo que destas 90% são infeções por HPV de alto/provável alto risco. A maioria das alterações citológicas apareceram em amostras com HPV positivo e, dentro destas, as lesões mais graves surgiram, na sua maioria, em amostras com infeção múltipla.

Das 994 amostras testadas para a presença de DNA viral do HPV, cerca de 70% apresentaram resultado negativo e 28% apresentaram resultado positivo. Comparando com a literatura, estes valores enquadram-se no intervalo estimado de prevalência do HPV na população mundial que se situa, em média, entre os 6.1% e os 35.5%. ^(12,93) Esta prevalência depende, por um lado, da tecnologia

inerente ao estudo dado que existem diversos kits de diagnóstico e cada um pode detetar um grupo diferente de tipos de HPV, por outro da quantidade total de amostras testadas e, ainda, das características específicas do grupo responsável por estas, uma vez que a existência ou não de comportamentos de risco dos indivíduos em estudo pode influenciar a frequência dos vários de tipos de vírus. ⁽¹²⁾ Das amostras positivas para o HPV, a grande maioria (cerca de 90%) apresenta vírus considerados de alto/provável alto risco, o que pode dever-se ao facto de haver um elevado número de vírus considerados de alto risco ou até ao facto de a técnica utilizada detetar mais vírus de alto risco que de baixo risco. Tal como os estudos já levados a cabo até hoje ^(12,20,64,68,114), o HPV 16 foi o mais frequente dos vírus de alto risco/provável alto risco, seguido do 31, 51 e 56. Também como já foi demonstrado anteriormente por Clifford *et al*, dos vírus de baixo risco o 42 é o mais prevalente. ⁽²⁰⁾

Para as amostras com pesquisa de DNA viral negativo, mais de 50% apresentou, tal como esperado, uma citologia normal. Há a realçar um elevado número de casos de citologias com inflamação, o que na classificação de Bethesda é considerado um achado não neoplásico ⁽²⁾, e que é perfeitamente natural aparecer em amostras com HPV negativo, dado que uma inflamação pode dever-se a vários fatores incluindo a presença de um outro agente infeccioso (que não o HPV), o ciclo menstrual no momento da colheita ou simplesmente a falta de higiene regular. A existência de alterações celulares (não neoplásicas) associadas à presença de *Candida spp* também se tornou evidente, embora com menos expressão (2,57%). Apesar de não ter sido detetado HPV nestas amostras, estes casos deverão ficar sob vigilância, uma vez que a presença de outros microrganismos (ex: *Candida spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* ou *Chlamydia trachomatis*) tem sido associada à infeção por HPV podendo funcionar como co-factores. ^(65,92) Também foram observadas alterações celulares (não neoplásicas) associadas à utilização do DIU ou à presença de atrofia, mas em pequenas quantidades. Mais de 8% das amostras referidas apresentavam células escamosas atípicas de significado indeterminado – ASCUS – e 0,14% apresentavam células escamosas atípicas não se excluindo lesão intraepitelial de alto grau – ASC-H. Estas duas categorias correspondem a um diagnóstico de

incerteza, porque embora pareça haver alterações citológicas sugestivas de lesão intraepitelial estas são qualitativa ou quantitativamente insuficientes para permitir ter a certeza de que de facto esse é o diagnóstico correto. ^(56,67) O facto de esta classificação estar associada à não presença do HPV não significa que possa ser ignorada. Estudos anteriores já demonstraram que a probabilidade de surgirem lesões intraepiteliais em testes posteriores é bastante elevada. ⁽²⁾ A dúvida no momento da avaliação da citologia pode dever-se ao facto de as lesões agora existentes serem ainda pouco visíveis. O facto de a pesquisa do DNA viral dar negativa não significa que o HPV não seja de facto a causa destas lesões, uma vez que a técnica utilizada não deteta todos os HPV existentes e, por outro lado, pode haver alguma falha no processo de extração, levando à extração de quantidade insuficiente de DNA. As mesmas premissas podem ser a razão para surgirem, ainda com a pesquisa do DNA viral negativa, lesões visíveis e tradutoras de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) ou de alto grau (HSIL) como aconteceu neste estudo em 1,28% e 0,14% dos casos, respetivamente. Estes casos cujos resultados, à partida, parecem não ser concordantes entre si, têm de ser avaliados não só tendo em conta os fatores já enunciados, mas também levando em consideração o historial de cada indivíduo que pode ajudar a clarificar algum diagnóstico mais difícil.

No caso das amostras com pesquisa de DNA viral do HPV positiva, a quantidade de citologias normais decresce consideravelmente, mas ainda corresponde a cerca de 27% dos casos. Este valor contrasta com os cerca de 2% de citologias com lesões intraepiteliais em que não foi detetado o DNA do vírus. Este poderá ser um indicador de uma maior fiabilidade da técnica molecular em relação à técnica citológica. Existem, no entanto, algumas razões que podem justificar esta diferença, pelo que se torna difícil chegar a uma conclusão definitiva. Estas razões correspondem, por exemplo, ao princípio já aqui anunciado de que a infeção pelo vírus HPV é “causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do cancro do cólo do útero”, pelo que muitas das infeções causadas pelo HPV são eliminadas pelo organismo nunca chegando a desenvolver sintomas no hospedeiro. ^(66,90,96,105) Por outro lado estas citologias normais podem corresponder à presença de baixa concentração de vírus que são

detectados numa fase inicial da doença, em que ainda não são detetadas lesões citológicas que poderão, eventualmente, surgir mais tarde, pelo que é importante manter a vigilância, de modo a esclarecer se o organismo é capaz de eliminar o vírus ou não.⁽⁴¹⁾ Outra razão plausível para justificar estes valores é a presença de falsos negativos nas citologias que podem ser devidos a falhas ocorridas durante a colheita, uma vez que esta técnica depende diretamente do(a) técnico(a) que efetuar a colheita. A citologia é uma técnica manual que pode ser afetada pelo erro humano, o que coloca em causa a eficácia deste método. Foram registadas cerca de 17% de citologias com inflamação que podem, ou não, estar associadas à presença de HPV. Achados associados à presença de *Candida spp*, à utilização do DIU ou a atrofia foram detectados, mas em muito pouca quantidade. Mais uma vez estes casos têm de ser seguidos de perto pelo clínico responsável, porque o facto de a pesquisa do HPV ser positiva pode indicar uma predisposição para a pessoa em causa vir a apresentar lesões celulares e, consequentemente, desenvolver carcinoma do útero.^(2,41) Notório foi o aumento significativo da presença de ASCUS (17,89%), ASC-H (1,40%), LSIL (24,91%) e HSIL (6,32%) nas amostras com HPV positivo em relação às amostras com HPV negativo, tendo surgido também um caso de carcinoma. Estes são os resultados esperados, coerentes com a relação já comprovada entre a infeção por HPV e este tipo de lesões.^(14,66,96,105) A percentagem de casos de ASCUS, ASC-H e LSIL não difere muito entre as amostras com vírus de diferentes graus de risco. Já a quantidade de amostras que apresentam HSIL é superior nos casos em que o(s) vírus se classifica(m) como de alto risco/provável alto risco, o que está de acordo com o que já foi descrito em estudos anteriores.^(66,96)

O facto de haver uma considerável diferença nos casos de ASCUS e de LSIL quando se deteta a presença de apenas um vírus ou de mais do que um vírus também foi notório. As amostras que possuem mais do que um vírus apresentam uma maior percentagem de casos de ASCUS e LSIL do que as amostras que apenas contenham um vírus. Esta tendência também se verifica nas amostras que apresentam mais do que um vírus de mais do que um tipo de risco. A presença de múltiplos tipos de HPV e a sua relação com uma maior probabilidade de provocar doença ou de aumentar a severidade dos seus

sintomas tem sido pouco estudada e os resultados já obtidos têm sido controversos, uma vez que alguns estudos deram esta relação como provada enquanto outros detetaram a relação exatamente oposta. ^(15,57,79,110) Apesar de recentemente terem surgido mais estudos que defendem a associação entre as infeções provocadas por múltiplos tipos de HPV e o risco de desenvolver doença, estes ainda não conseguiram clarificar o(s) verdadeiro(s) motivo(s) que justifiquem tal relação. ^(15,57,77,110) Uma das hipóteses apresentadas é que a co-infecção por HPV pode favorecer a instalação de um dos vírus, sendo este o principal responsável pelo tumor. Esta hipótese é apoiada por alguns estudos onde infeções provocadas por um vírus terão sido favorecidas por infeções prévias provocadas por outros vírus. ⁽⁵⁷⁾

De modo geral, as repetições realizadas são concordantes entre si. Em 3 das 15 utentes (repetições 2, 12 e 14) em que foram recolhidas amostras diferentes para repetição de análise os resultados apresentados são ambos negativos. Noutros 3 casos (repetições 4, 6 e 15) a pesquisa do DNA viral mantém-se negativa da primeira para a segunda análise, havendo oscilação nos resultados das citologias, detetando-se a alteração de inflamação para ASCUS num dos casos, de ASCUS para inflamação noutra caso e ainda de atrofia para inflamação noutra. Estes resultados podem dever-se à presença de outro agente inofensivo ou de um genótipo de HPV não detetado, o que deve alertar o clínico para a vigilância deste tipo de utentes. Noutras 3 utentes (repetições 5, 7 e 10), cuja primeira análise foi positiva para a deteção do HPV, a repetição da análise poderá indicar que a infeção existente terá sido tratada, uma vez que após algum tempo ambas as técnicas deram resultados negativos. Em duas situações (repetições 9 e 11), após mais de seis meses, ambas as análises dão positivas e concordantes quer na técnica molecular quer na citológica, o que indica que estas duas utentes têm uma infeção persistente. As repetições 1 e 13 são casos que, sempre que surjam, devem ser avaliados com muita cautela pelos clínicos, dado que apresentam um tipo de vírus na primeira pesquisa e uma infeção múltipla causada por outros tipos de vírus na segunda pesquisa que foi efetuada com mais de seis meses de diferença. Os resultados citológicos mantêm-se na repetição 1, enquanto na repetição 13 passam de normal no primeiro exame a ASCUS no

segundo, o que só reforça a necessidade de vigilância. Estes resultados podem indicar que os indivíduos em causa terão sido alvo de tratamento após a primeira pesquisa, tendo sido infetados novamente por outros vírus. Outra explicação possível para estes casos é um possível erro numa das pesquisas do DNA viral, o que, a ser verdade, coloca em causa a fiabilidade da técnica molecular em uso e leva a questionar a confiança que os clínicos devem depositar exclusivamente nos métodos moleculares. A utente cujos resultados estão representados na repetição nº3 apresenta na primeira pesquisa o HPV 45 enquanto a segunda pesquisa deu negativa. Contudo, o resultado da citologia passou de normal no primeiro exame a ASCUS na segunda citologia. Este tipo de situações deixa dúvidas relativamente ao início do tratamento após a segunda citologia, uma vez que a infeção pode não ser por HPV. Na repetição 8 é colocada em causa a infabilidade das técnicas citológicas, porque com um mês de diferença observa-se uma alteração considerável no resultado das duas citologias efetuadas. Na pesquisa de DNA viral foi detetado nas duas análises, o HPV 31 (alto risco) mas o resultado da citologia passa de normal a LSIL, no intervalo de um mês. O resultado da primeira citologia deve ser um falso negativo.

Das 994 amostras apenas 28 foram submetidas à técnica histológica, pelo que não é possível retirar informações conclusivas. Podemos, no entanto, referir que das biópsias realizadas nas amostras testadas com resultado de pesquisa do DNA viral negativo, a maioria surgiu sem alterações compatíveis com infeção por HPV, como seria de esperar. Em três destas amostras apareceram alterações compatíveis com infeção por HPV, contudo, e mesmo sendo a pesquisa viral negativa, estas alterações estão associadas a citologias com ASCUS. Apesar do número de casos ser muito pequeno, é possível prever que estes casos possam estar relacionados com vírus cujos tipos não são detectados pela técnica usada neste estudo, ou então que a extração do DNA foi feita de forma deficiente não possibilitando a deteção do vírus. Das biópsias realizadas nas amostras testadas com resultado da pesquisa de DNA viral positivo, a maioria surgiu com algum tipo de alterações relacionados com infeção por HPV, apresentando lesões compatíveis com CIN I, II e/ou III ou condiloma. Estes resultados estiveram quase sempre associados a citologias com LSIL, HSIL e ASCUS. Houve ainda algumas

biopsias que surgiram sem qualquer alteração, estando estas associadas a citologias normais, com inflamação ou ASCUS. Embora o número de biópsias realizadas tenha sido reduzido podemos observar que estes casos ocorreram ou numa fase muito inicial da infeção o que justifica a falta de sintomas, ou em indivíduos capazes de neutralizar a infeção antes que esta provoque quaisquer outros danos. Em qualquer dos casos acima referidos, é muito importante que os clínicos estejam atentos à evolução de possíveis sintomas que possam surgir, pelo que os programas de rastreio são cruciais na prevenção desta doença.

O intervalo das idades das mulheres que foram testadas comprova que não existe limite de idade para a presença do vírus. Neste estudo houve casos positivos em mulheres com idades compreendidas entre os 19 e os 67 anos. Apesar de haver uma maior incidência de casos positivos de HPV nas faixas etárias abaixo dos 40 anos, estes resultados corroboram a informação de que qualquer mulher, independentemente da idade, apresenta um risco de infeção elevado. Devido ao facto de não haver dados relativos aos comportamentos sexuais dos indivíduos em estudo, não é possível associar este risco de infeção a esses mesmos comportamentos, apesar de se poder presumir que este grupo de mulheres seja sexualmente activo. ^(16,66)

Capítulo VI – Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo pela técnica citológica e pelo método molecular são, de modo geral, concordantes, havendo, contudo, casos que colocam em dúvida a eficácia total de ambos os métodos. Assim é possível concluir que as técnicas citológicas e moleculares se complementam sendo, no entanto, difícil fazer um diagnóstico correto tendo como base unicamente uma delas, pelo que dificilmente se irá assistir, nos próximos tempos, a uma uniformização de métodos. Podemos aferir, então, que as técnicas moleculares não são suficientemente eficazes para substituir as técnicas citológicas nos rastreios de primeira linha, mas ambas as técnicas devem ser usadas em conjunto de modo a que os resultados de uma complementem os resultados da outra. Por um lado, enquanto a presença de lesões na citologia dá a indicação de doença, a pesquisa do DNA do HPV dá uma orientação quanto ao acompanhamento e monitorização adequados dos doentes infetados, tendo um papel importante no controlo da lesão e respetiva progressão. ^(15,41,44,115) A deteção positiva de DNA viral, mesmo na ausência de lesões citológicas, alerta o clínico para uma vigilância mais apertada dado que a presença de vírus aumenta a probabilidade de surgimento de doença. ^(2,41) Ao haver um seguimento mais regular deste tipo de utentes, a deteção de doença, a acontecer, é feita mais precocemente permitindo reduzir os riscos de progressão maligna e, conseqüentemente, diminuir os custos que os tratamentos mais agressivos comportam. ^(44,115) Por outro lado, o uso exclusivo da deteção do DNA viral do HPV pode aumentar o risco de falsos positivos, porque nem sempre a presença de HPV significa desenvolvimento de doença cervical. Este facto pode levar ao uso excessivo da colposcopia e a um sofrimento psicológico desnecessário. ^(3,25) É importante perceber também que qualquer método de diagnóstico é falível, uma vez que o resultado de uma citologia depende da execução humana passível de ser efetuada de forma errada e os métodos moleculares dependem da sensibilidade e especificidade dos kits usados, fatores que também podem influenciar o diagnóstico. ^(44,70)

Através deste estudo é possível afirmar que ambos os métodos são importantes, quer numa perspetiva de prevenção quer no seguimento de casos já identificados. Um bom programa de rastreio pode evitar o aumento do número de casos de cancro do cólo do útero ao detetar, precocemente, qualquer sinal de lesão, podendo, inclusive, evitar a sua progressão maligna, dado que o encaminhamento dos casos positivos para tratamento também poderá ser feito com maior antecedência.⁽³⁾ A abordagem a seguir deve, no entanto, depender de diversos fatores e não apenas num resultado positivo. O historial clínico e familiar, a anatomia do colo uterino que se vai alterando com a idade (e que pode afetar o resultado da citologia), os comportamentos sexuais de cada utente ou até medicamentos que estejam a tomar são exemplos de condicionantes importantes a ter em conta no momento do diagnóstico e consequente acompanhamento.^(70,112) Teria sido interessante associar este tipo de fatores aos resultados, contudo neste estudo não foi possível fazer o levantamento dos dados em questão.

Este trabalho contribui, também, para reforçar a ideia de que há uma necessidade urgente de bons programas de rastreio em Portugal que, a par com o que já tem sido feito na zona centro⁽¹¹⁴⁾, poderiam informar e alertar a população e permitir que as instituições governamentais e a comunidade médica unissem esforços com o objetivo de diminuir o número de casos de cancro do cólo do útero.

Serão necessários, ainda, mais estudos que permitam uma melhoria constante das tecnologias já existentes e o surgimento de novas tecnologias proporcionando o desenvolvimento de técnicas mais eficazes e sensíveis e que possibilitem, de forma rápida e fácil, detetar lesões tradutoras de doença e identificar os vários tipos de HPV com risco oncogénico. É muito importante também que se proceda à avaliação do desempenho destes testes de modo a que se possa chegar a um consenso e a um conjunto de normas que, de forma global, possa orientar os médicos no diagnóstico correto deste tipo de cancro.

Capítulo VII – Referências Bibliográficas

- 1 - ABDALI, K.; SOLEIMANI, M.; KHAJEHEI, M.; TABATABAEE, H.R.; KOMAR, P.V.; MONTAZER, N.R.; Comparison of Pap Smear Quality with Anatomical Spatula and Convenience (Spatula-Cytobrush) Methods: A Single Blind Clinical Trial. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 11 (2010), 1769-1772.
- 2 - APGAR, B.S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T.C.; The 2001 Bethesda System Terminology. **American Family Physician**. 68:10 (2003), 1993-1998.
- 3 - ARBYN, M.; ANTTILA, A.; JORDAN, J.; RONCO, G.; SCHENCK, U.; SEGMAN, N.; WIENER, H.; HERBERT, A.; VON KARSA, L.; European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document. **Annals of Oncology**. 21 (2010), 448–458.
- 4 - ARMSTRONG, E. P.; Prophylaxis of Cervical Cancer and Related Cervical Disease: A Review of the Cost-Effectiveness of Vaccination Against Oncogenic HPV Types. **Journal of Managed Care Pharmacy**. 16:3 (2010), 217-230.
- 5 - BAILEY, J. V.; KAVANAGH, J.; OWEN, C.; McLEAN, K.; SKINNER, C.J.; Lesbians and cervical screening. **British Journal of General Practice**. 50: 455 (2000), 481-482.
- 6 - BASEMAN, J.; KOUTSKY, L.; The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**. 32:supl. (2005), S16-S24.
- 7 - BHARTI, A.C.; SHUKLA, S.; MAHATA, S.; HEDAU, S.; DAS, B.C.; Anti-human papillomavirus therapeutics: Facts & future. **The Indian Journal of Medical Research**. 130:3 (2009), 296-310.

- 8 - BHATLA, N.; MODA, N.; The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. **The Indian Journal of Medical Research**. 130:3 (2009), 261-265.
- 9 - BOONLIKIT, S.; SRISANTIROJ, N.; Is there any Clinical Advantage in Separating CIN 2 from CIN 3 in the Current Two-tiered Cytological Classification? **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 10 (2009), 115-118.
- 10 - BOSCH, F.X.; SANJOSÉ, S.; CASTELLSAGUÉ, X. **Virus del Papiloma Humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención**. Barcelona: ANALES.
- 11 - BRAGAGNOLO, A.L.; ELI, D.; HAAS, P.; Papiloma Vírus Humano (HPV). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 42:2 (2010), 91-96.
- 12 - BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; FERRER, E.; BOSCH, F.X.; SANJOSÉ, S.; Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. **The Journal of Infectious Diseases**. 202:12 (2010), 1789-1799.
- 13 - CAMARA, G.; CRUZ, M.; VERAS, V.; MARTINS C.; Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**. 1:1 (2003), 149-158.
- 14 - CAMARA, G.; CRUZ, M.; VERAS, V.; MARTINS, C.; Os papilomavírus humanos – HPV: Carcinogênese e imunogênese. **Universitas Ciências da Saúde** 1:1 (2003), 159-168.
- 15 - CAÑADAS, M. P.; LLOVERAS, B.; LORINCZ, A.; EJARQUE, M.; FONT, R.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. **Salud Pública de México**. 48:5 (2006), 373-378.

16 - CAVACO, A.; NABAIS, H.; JORGE, A. F.; SOUSA, H.; HENRIQUES, A.; BELO, J.; MATOS, A.; BORREGO, J.; PISTA, Â.; MOUTINHO, J.M.; OLIVEIRA, C.F.; OLIVEIRA, J.M.; MARQUES, C.; BARROS, M.; BICHO, C.; VALENTE, P.; SILVA, D.P.; CASTRO, P.V.; MOTA, F.; MEDEIROS, R.; SOLHEIRO, H.; GUIMARÃES, S.; Vacinas contra o HPV - Reunião de Consenso Nacional. **Sociedade Portuguesa de Ginecologia**. (2010), 1-27.

17 - CHAMOT, E.; KRISTENSEN, S.; STRINGER, J.S.A.; MWANAHAMUNTU, M.H.; Are treatments for cervical precancerous lesions in less-developed countries safe enough to promote scaling-up of cervical screening programs? A systematic review. **BMC Women's Health**. 10:11 (2010), 1-11.

18 - CHAUDHARY, A.K.; PANDYA, S.; MEHROTRA, R.; BHARTI, A.C; SINGH, M.; SINGH, M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. **Virology Journal**. 7:253 (2010), 1-10.

19 - CHOW, L.; BROKER, T; STEINBERG, B. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Journal Compilation**. 118:6-7 (2010), 422-449.

20 - CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J. F.; VACARELLA, S.; ANH, P. T. H.; FERRECCIO C.; HIEU, N. T.; MATOS, E.; MOLANO, M.; RAJKUMAR, R.; RONCO, G.; SANJOSÉ, S; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S; THOMAS, J. O.; TUNSAKUL, S.; MEIJERM, C. J. L. M.; FRANCESCHI, S.; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**. 366 (2005), 991–998.

- 21 - COLGAN, T.J.; Pap test results: Responding to Bethesda system reports. **Canadian Family Physician**. 47 (2001), 1425-1430.
- 22 - Conselho Nacional de Oncologia; Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas 2007/2010 (PNPCDO): Orientações Programáticas. **Alto Comissariado para a Saúde**. (2007)
- 23 - CREAGH, T.; BRIDGER, J.E.; KUPEK, E.; FISH, D.E.; MARTIN-BATES, E; WILKINS, M.J.; Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**. 48 (1995), 59-60.
- 24 - CRUM, C.P.; Laboratory Management of CIN 2. **American Journal of Clinical Pathology**. 130 (2008), 162-164.
- 25 - DALSTEINA, V.; MERLIN, S.; BALI, C.; SAUNIERC, M.; DACHEZD, R.; RONSINB, C.; Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**. 156 (2009), 77–83.
- 26 - Decreto Lei Nº 190 — 17 de Agosto de 2001. *Diário da República nº 129/2001- I SÉRIE-B*. Ministério da Saúde. Lisboa.
- 27 - © DEMAND MEDIA 2011. **ESSORTMENT: George Papanicolaou: Inventor Of The Pap Smear**. [em linha] USA: © DEMAND MEDIA 2011. [Consult. 25 Abr. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://www.essortment.com/george-papanicolaou-inventor-pap-smear-63039.html>
- 28 - DILLNER, J.; ARBYN, M.; UNGER, E.; DILLNER, L.; Monitoring of human papillomavirus vaccination. **Clinical and Experimental Immunology**. 163:1. (2010), 17-25.

- 29 - DOORBAR, J.; The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**. 32:supl. (2005), S7-S15.
- 30 - FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; LONGO, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. - **HARRISON'S – PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE**. 17ª edição. Estados Unidos da América: *The McGraw-Hill Companies, Inc.*, 2008. ISBN 978-0-07-146633-2
- 31 - FERREIRA, M.; CRESPO, M.; MARTINS, L.; FÉLIX, A.; HPV DNA detection and genotyping in 21 cases of primary invasive squamous cell carcinoma of the vagina. **Modern Pathology**. 21 (2008), 968–972.
- 32 - FERREIRA, W.F.C; SOUSA, J.C.F. - **Microbiologia – Volume 3**. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda., 2002.
- 33 - FLORES, Y.N.; BISHAI, D.M.; SHAH, K.V.; PONCE, E.L.; LÖRINCZ, A.; HERNANDEZ, M.; FERRIS, D.F.; SALMÉRON, J. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. **Salud Pública de México**. 50:1 (2008), 49-58.
- 34 - FRISCH, M.; GOODMAN, M.T.; Human Papillomavirus-Associated Carcinomas in Hawaii and the Mainland U.S. **Cancer**. 88:6. (2000), 1464-1469.
- 35 - FUCHS, S.; FLUHR, J.; BANKOVA, L.; TITTELBACH, J.; HOFFMANN, G.; ELSNER P.; Photodynamic therapy (PDT) and waterfiltered infrared A (wIRA) in patients with recalcitrant common hand and foot warts. **German Medical Science**. 2:8. (2004), 1-16.
- 36 - GAGE, J.C.; RODRIGUEZ, A.C.; SCHIFFMAN, M.; GARCIA, F.A.; LONG, L.R.; BUDIHAS, S.; HERRERO, R.; BRUK, R.D.; JERONIMO, J.; Treatability by Cryotherapy in a Screen-and-Treat Strategy. **Journal of Lower Genital Tract Disease**. 13:3 (2009), 174–181.

37 - GENOMICA, S.A.U.; *CLART® PAPILOMAVIRUS HUMANO 2* - Genotipagem de Papilomavirus Humano por Identificação Genómica para Diagnóstico *in vitro*. Versão 9 (2010); Madrid, Spain: Genomica, S.A.U.

38 - GEORGE, F.H.M.; Programa Nacional de Vacinação (PNV), Introdução da vacina contra infeções por Vírus do Papiloma Humano - Circular Normativa. **Direcção Geral da Saúde**. (2008) 1-9.

39 - GHAEMMAGHAMI, F.; NAZARI, Z.; MEHRDAD, N.; Female Genital Warts. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 8 (2007), 339-347.

40 - GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.; TOMMASINO, M.; The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**. 40:1 (2010), 1-13.

41 - GOUVEIA, S.; Detecção de DNA de HPV oncogénico por captura híbrida em citologias normais. Dissertação de mestrado em Biologia Molecular e Celular. Aveiro: Universidade de Aveiro, 2009.

42 - GREINER BIO-ONE GmbH; PapilloCheck® DNA Extraction kit – Instructions for Use. Revision 01 (2009) Frickenhausen, Germany: Greiner Bio-One GmbH.

43 - GREINER BIO-ONE GmbH; PapilloCheck® Manual. Versão BQ-013-05 (2009) Frickenhausen, Germany: Greiner Bio-One GmbH.

44 - GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, A.; Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra** 33:1. (2010), 71-77.

45 - HALFONA, P.; BENMOURAA, D.; KHIRIB, H.; PENARANDAC, G.; BLANCA, B.; RIGGIOD, D.; SANDRID, M.T.; Comparison of the clinical performance of

carcinogenic HPV typing of the Linear Array and Papillocheck® HPV-screening assay. **Journal of Clinical Virology**. 47:1 (2010), 38–42.

46 - HASKEN, T.J.; A Duty to Kiss and Tell? Examining the Uncomfortable Relationship Between Negligence and the Transmission of HPV. **IOWA LAW REVIEW**. 95 (2010), 985-1009.

47 - HAUSEN, H.; Papilomaviruses and Cancer: from basic studies to clinical application. **Nature**. 2 (2002), 342-350.

48 - HEALTHWISE STAFF, SARAH MARSHALL, KIRTLY JONES – **WebMD, Cervical Cancer Health Center**. [em linha] Atlanta, USA: WebMD, LLC. [Consult. 3 Jul. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://www.webmd.com/cancer/cervical-cancer/cone-biopsy-conization-for-abnormal-cervical-cell-changes>

49 - HERNANDEZ, B.Y.; WILKENS, L.R; ZHU, X.; THOMPSON, P.; MCDUFFI, K.; SHVETSOV, Y.B; KAMEMOTO L.E.; KILLEEN, J.; NING, L.; GOODMAN, M.T.; Transmission of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples. **Emerging Infectious Diseases**. 14:6 (2008), 888-894.

50 - HOLOGIC, Inc.; - **The Thin-Prep Pap Test**. [em linha] New York, USA: Hologic, Inc. [Consult. 6 Set. 2011] Disponível em WWW:<URL: http://www.thinprep.com/hcp/lab_professionals/imaging_system/thinprep_2000.html

51 - HOLSCHNEIDER, C.H.; **UpToDate - Cervical intraepithelial neoplasia: Definition, incidence, and pathogenesis**. [em linha] USA: UpToDate, Inc. [Consult. 10 Abr. 2011] Disponível em WWW:<URL: http://www.uptodate.com/contents/cervical-intraepithelial-neoplasia-definition-incidence-and-pathogenesis?source=see_link&anchor=H1#subscribeMessage~

- 52 - IFTNER, T.; EBERLE, S.; IFTNER, A.; HOLZ, B.; BANIK, N.; QUINT, W.; STRAUBE, A.N.; Prevalence of Low-Risk and High-Risk Types of Human Papillomavirus and Other Risk Factors for HPV Infection in Germany Within Different Age Groups in Women up to 30 Years of Age: An Epidemiological Observational Study. **Journal of Medical Virology**. 82:11 (2010), 1928-1939.
- 53 - JAMISON, J.; WILSON, R. T.; CARSON, J.; The evaluation of human papillomavirus genotyping in cervical liquid-based cytology specimens; using the Roche Linear Array HPV genotyping assay. **Cytopathology**. 20:4 (2009), 242-248.
- 54 - KADAJA, M.; ISOK-PAAS, H.; LAOS, T.; USTAV, E.; USTAV, M.; Mechanism of Genomic Instability in Cells Infected with the High-Risk Human Papillomaviruses. **Public Library of Science - PLoS Pathogens**. 5:4 (2009), 1-16.
- 55 - KIM, K.Y.; BLATT, L.; TAYLOR, M.W.; The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. **Journal of General Virology**. 81 (2000), 695-700.
- 56 - LEE, C.Y.; NG, W.; A Follow-up Study of Atypical Squamous Cells in Gynecologic Cytology Using Conventional Papanicolaou Smears and Liquid-Based Preparations. **American Journal of Clinical Pathology**. 127 (2007), 548-555.
- 57 - LEON, S.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R.; MUNOZ, M.; PRADOS, A.; PURROY, A.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A.; Distribution Patterns of Infection with Multiple Types of Human Papillomaviruses and Their Association with Risk Factors. **Public Library of Science – PloS ONE**. 6:2 (2011), 1-7.
- 58 - LETIAN, T.; TIANYU, Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. **Virology Journal**. 7:2 (2010), 1-7.

59 - LIN, K.; DOOLAN, K.; HUNG, C.; WU, T.C.; Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. **Journal of the Formosan Medical Association**. 109:1 (2010), 4–24.

60 - LOUIE, K.S.; SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE X.; HERRERO, R.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.; FRANCESCHI, S.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. **British Journal of Cancer**. 100 (2009), 1191-1197.

61 - LOUIE, K.; SANJOSÉ, S.; MAYAUD, P.; Cervical cancer prevention in Africa. **Africa Health**. (2009), 27-29.

62 - LOUIE, L.S.; SANJOSE, S.; MAYAUD, P.; Epidemiology and prevention of human papillomavirus and cervical cancer in sub-Saharan Africa: a comprehensive review. **Tropical Medicine & International Health**. 14:10 (2009), 1287-1302.

63 - MOUTINHO, J.A.F.; Neoplasia intraepitelial vulvar: um problema actual. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 30:8 (2008), 420-6.

64 - MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **The New England Journal of Medicine**. 348:6 (2003), 518-527.

65 - MURTA, E.; SOUZA, M.; JÚNIOR, E.; ADAD, S; Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* and human papilloma virus in cytological smears. **São Paulo Medical Journal**. 118:4 (2000), 105-8.

66 - NAKAGAWAL, J.T.T.; SCHIRMERL, J.; BARBIERIL, M.; Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**. 63:2 (2010), 307-311.

- 67 - NASCIMENTO, A.; CIBAS, E.S.; The ASC/SIL Ratio for Cytopathologists as a Quality Control Measure. **American Journal of Clinical Pathology**. 128 (2007), 653-656.
- 68 - NOBRE, R.J.; CRUZ, E.; REAL, O.; ALMEIDA, L.P.; MARTINS, T.; Characterization of Common and Rare Human Papillomaviruses in Portuguese Women by the Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing. **Journal of Medical Virology**. 82:6 (2010), 1024-1032.
- 69 - NYITRAY, A.G.; SILVA, R.J.C.; BAGGIO, M.L.; LU, B.; SMITH, D.; ABRAHAMSEN, M.; PAPENFUSS, M.; VILLA, L.; LAZCANO-PONCE, E.; GIULIANO, A.R.; Age-Specific Prevalence of and Risk Factors for Anal Human Papillomavirus (HPV) among Men Who Have Sex with Women and Men Who Have Sex with Men: The HPV in Men (HIM) Study. **The Journal of Infectious Diseases**. 203 (2011), 49–57.
- 70 - ORTIZ, J.O.; MOLINA, R.M.; LÓPEZ, M.P.; CRUZ, M.G.; QUIJANO, T.H.; ELIZONDO, C.V.; VALENCIA, M.H. Comparación de la toma de citología cervical con calidad satisfactoria con el método Cervex-brush o Cervex-mex. **Ginecología y Obstetricia de México**. 76:7 (2008), 381-385.
- 71 - OWENS, C.L.; MOATS, D.; BURROUGHS, F.H.; GUSTAFSON, K.S.; “Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, Cannot Exclude High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion” Is a Distinct Cytologic Category. **American Journal of Clinical Pathology**. 128 (2007), 398-403.
- 72 - PACHECO, A.; PEDRO, A.; COLAÇO, A.; PEREIRA, A.; ALVES, B.; CASTELÃO, C.; SALDANHA, C.; PAREDES, E.; CRUZ, E.; PERALTA, F.; SILVA, G.; NASCIMENTO, H.; OLIVEIRA, I.; SARAIVA, J.; CABRAL, J.; BRANCO, M.; SOUSA, R.; FRAGA, T.; PAULA, T.; REBELO, T.; MONTEIRO, V.; CAEIRO, V.; NETO, V.; RODRIGUES, V.; GOMES, Z.; Consenso sobre INFECÇÃO HPV E

LESÕES INTRAEPITELIAIS DO COLO, VAGINA E VULVA. **Sociedade Portuguesa de Ginecologia; Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal.** (2011)

73 - PARADA, R.; MORALES, R.; GIULIANO, A.R.; CRUZ, A.; CASTELLSAGUE, X.; LAZCANO-PONCE, E.; Prevalence, concordance and determinants of human papillomavirus infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico. **BMC Infectious Diseases.** 223 (2010)

74 - PATELA, D.A.; SHIHB, Y.; NEWTONC, D.W.; MICHAELC, C.W.; OETHD, P.A.; KANEE, M. D.; OPIPARIA, A.W.; RUFFINF, M.T.; KALIKINB, L.; KURNIBT, D.M.; Development and Evaluation of a PCR and Mass Spectroscopybased (PCR-MS) Method for Quantitative, Type-specific Detection of Human Papillomavirus. **Journal of Virological Methods.** 160:1 e 2 (2009), 78-84.

75 - PAUL INDMAN – **Alternatives in Gynecology.** [em linha] California, USA: ♀BGYN.net. [Consult. 3 Jul. 2010] Disponível em WWW:<URL: <http://www.gynalternatives.com/treatment.htm>

76 - PERALTA, O.; BERMÚDEZ, V.; VICENTE, M.; RNA interference: biogenesis, molecular mechanisms and its applications in cervical cancer. *Revista de Investigação Clínica.* 62:1 (2010), 63-80.

77 - PEREIRA, A.S.T.; Genotipagem do vírus do Papiloma Humano em citologia cérvico-vaginal. Dissertação de mestrado em Biologia Molecular e Celular. Aveiro: Universidade de Aveiro, 2010.

78 - PISTA, A.; VERDASCA, N.; OLIVEIRA, A.; Clinical Performance of the CLART Human Papillomavirus 2 Assay Compared With the Hybrid Capture 2 Test. **Journal of Medical Virology.** 83 (2011), 272–276.

79 - PISTA, A.; OLIVEIRA, A.; VERDASCA, N.; RIBEIRO, F.; Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. **Clinical Microbiology and Infection**. (2010), 1-6.

80 - POLJAK, M.; KOCJAN, B.J.; Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 8:10 (2010), 1139–1162.

81 - POLJAL, M.; KOVANDA, A.; KOCJAN, B. J.; SEME, K.; JANCAR, N.; VRTACNIK-BOKAL, E.; The Abbott RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**. 18:3 (2009), 94-103.

82 - PORRAS, C.; BENNETT, C.; SAFAEIAN, M.; COSEO, S.; RODRIGUEZ, A.C.; GONZALEZ, P.; HUTCHINSON, M.; JIMENEZ, S.; SHERMAN, M.; WACHOLDER, S.; SOLOMON, D.; van DOORN, L.; BOUGELET, C.; QUINT, W.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; Determinants of seropositivity among HPV-16/18 DNA positive young women. **BMC Infectious Diseases**. 10:238. (2010)

83 - POTOČNIK, M.; KOCJAN, B.J.; SEME, K.; POLJAK, M.; Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**. 16:3 (2007), 91-98.

84 - QIAGEN – **Sample & Assay Technologies**. [em linha] Netherlands: QIAGEN. [Consult. 1 Mai. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://www.qiagen.com/products/digenehigh-riskhpvttesthc2.aspx>

85 - RAMQVIST, T.; DALIANIS, T.; Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. **Emerging Infectious Diseases**. 16:11 (2010), 1671-1677.

- 86 - REIS, A.A.S.; PAULA, L.B.; PAULA, A.A.P.; SADDI, V.A.; CRUZ, A.D.; Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. **Ciência & Saúde Coletiva**. 15:1 (2010), 1105-1111.
- 87 - RIVOIRE, W.; CORLETA, H; BRUM, I.; CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. 6:4 (2006) 447-451.
- 88 - RODRIGUES A.; REIS, D.; UNIVERSIDADE DE ÉVORA. DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA. **Papilomavírus Humano: Biologia e Epidemiologia**. [em linha]. Évora: evunix. [Consult. 17 Nov. 2010] Disponível em WWW: <URL: http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2003/papiloma.htm#_Toc62671545
- 89 - ROMBALDI, R.L.; SERAFINI, E.P.; MANDELLI J.; ZIMMERMANN, E.; LOSQUIAVO K.; Transplacental transmission of Human Papillomavirus. **Virology Journal**. 5:106. (2008)
- 90 - ROSENBLATT, C. **HPV (Papilomavírus humano)**. [em linha]. Brasil:hpvinfo [Consult. 12 Dez. 2010] Disponível em WWW:<URL: <http://www.hpvinfo.com.br/hpv-livro.htm>
- 91 - SADLER, L.; SAFTLAS, A.; WANG, W.; EXETER, M.; WHITTAKER, J.; McCOWAN, L.; Treatment for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Risk of Preterm Delivery. **The Journal of the American Medical Association**. 291:17 (2004), 2100-2106.
- 92 - SAMOFF, E.; KOUMANS, E.; MARKOWITZ, L.; STERNBERG, M.; SAWYER, M.; SWAN, D.; PAPP, J.; BLACK, C.; UNGER, E.; Association of Chlamydia trachomatis with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. **American Journal of Epidemiology**. 162:7 (2005), 668-675.

- 93 - SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**. 7 (2007), 453–459.
- 94 - SEDMAN, T.; SEDMAN, J.; STENLUND, A.; Binding of the E1 and E2 Proteins to the Origin of Replication of Bovine Papillomavirus. **Journal of Virology**. 71:4 (1997), 2887-2896
- 95 - SHERWANI, R.K.; KHAN, T.; AKHTAR, K.; ZEBA, A.; SIDDIQUI, F.A.; RAHMAN, K. AFSAN, N. Conventional Pap Smear and Liquid Based Cytology for Cervical Cancer Screening – A Comparative Study. **Journal of Cytology**. 24:4 (2007), 167-172.
- 96 - SHUKLA, S.; BHARTI A.C.; MAHATA, S.; HUSSAIN, S.; KUMAR, R.; HEDAU, S.; DAS, B.C.; Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **The Indian Journal of Medical Research**. 130:3. (2009), 222-233.
- 97 - SILVA, A.; CRUZ, A.; SILVA, C.; BORGES, F.; CURADO, M. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 49:3 (2003), 167-174.
- 98 - SILVA, K.C.; ROSA, M.L.G.; MOYSES, N.; AFONSO, L.A.; OLIVEIRA, L.H.S.; CAVALCANTI S.M.B. Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104:6 (2009), 885-891.
- 99 - SINGHAL, P.; NASWA, S.; MARFATIA, Y.S.; Pregnancy and sexually transmitted viral infections. **Indian Journal of Sexual Transmitted Diseases**. 30:2 (2009), 71-78.

- 100 - SMITH E.M.; PARKER M. A.; RUBENSTEIN, L.M.; HAUGEN, T.H.; HAMSIKOVA, E.; TUREK, L.P.; Evidence for Vertical Transmission of HPV from Mothers to Infants. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**. 2010:326369 (2010), 1-7.
- 101 - SNIJDERS, P.J.F.; HEIDEMAN, D.A.M.; MEIJER, C.J.L.M.; Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. 118:6-7 (2010), 520-528.
- 102 - SOROKO, Y.; REPKING, M.; CLEMMENT, J.; MITCHELL, P.; BERG, R.; Treatment of Plantar Verrucae Using 2% Sodium Salicylate Iontophoresis. **Physical Therapy**. 82:12. (2002), 1184-1191.
- 103 - STANLEY, M.A.; Immune responses to human papilloma viruses. **Indian Journal of Medical Research**. 130:3. (2009), 266-276.
- 104 -- STUBENRAUCH, F.; HUMMEL, M.; IFTNER, T.; LAIMINS, L. A. The E8E2C Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes. **Journal of Virology**. 74:3 (2000), 1178–1186.
- 105 - SU, J.; WU, A.; SCOTNEY, E.; MA, B.; MONIE, A.; HUNG, C.; WU, T.C.; Immunotherapy for Cervical Cancer: Research Status and Clinical Potential. **Biodrugs**. 24:2. (2010) 109-129.
- 106 - SYRIPINEN, S.; PURONEN, M.; Human Papillomavirus Infections in Children: The Potential Role of Maternal Transmission. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. 11:2. (2000), 259-274.

107 - TAKEI, H.; RUIZ, B.; HICKS, J.; Comparison of Conventional Pap Smears and a Liquid-Based Thin-Layer Preparation. **American Journal for Clinical Pathology**. 125 (2006), 855-859.

108 - TAYLOR, S.; WANG, C.; WRIGHT, T.C.; DENNY, L.; TSAI, W.-Y.; KUHN, L.; Reduced acquisition and reactivation of human papillomavirus infections among older women treated with cryotherapy: results from a randomized trial in South Africa. **BioMed Central**. 8:40 (2010), 1-9.

109 - TROPE, A.; SJOBORG, K.; ESKILD, A.; CUSCHIERI, K.; ERIKSEN, T.; THORESEN, S.; STEINBAKK, M.; LAURAK, V.; JONASSEN, C.; WESTERHAGEN, U.; JACOBSEN, M.; LIE, A.K.; Performance of Human Papillomavirus DNA and mRNA Testing Strategies for Women with and without Cervical Neoplasia. **Journal of Clinical Microbiology**. 47:8 (2009), 2458-2464.

110 - TROTTIER, H.; MAHMUD, S.; COSTA, M.; SOBRINHO, J.; FRANCO, E.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; VILLA, L.; FRANCO, E.; Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 15:7 (2006), 1274-1280.

111 - U.S. NATIONAL LIBRARY of MEDICINE; NATIONAL INSTITUTES of HEALTH. **MedlinePlus - Cervical dysplasia**. [em linha] USA: ADAM. [Consult. 10 Abr. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001491.htm>

112 - U.S. NATIONAL LIBRARY of MEDICINE; NATIONAL INSTITUTES of HEALTH. **MedlinePlus - Pap smear**. [em linha] USA: ADAM. [Consult. 25 Abr. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003911.htm>

113 - VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; DAI, M.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; THOMAS, J.O.; ANH, P.T.H.; FERRECCIO, C.; MATOS, E.; POSSO, H.;

SANJOSE, S.; SHIN, H.R.S.; SUKVIRACH, S.; PONCE-LAZCANO, E.; RONCO, G.; RAJKUMAR, R.; QIAO, Y.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Reproductive Factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 15:11 (2006), 2148-2153.

114 - VENTURA, M.T.; FREITAS, M.G.; FRANCISCA, A.; LEÇA, A.; GONÇALVES, G.; AZEVEDO, J.; MANSINHO, K.; SANTOS, L.A.; ROCHA, L.; GOMES, M.C.; FERREIRA, M.M.; ROCHA, M.G.; CALE, M.E.; VALENTE, P.M.; VALENTE, P.; FERNANDES, T.M.A.; MEIRELES, A.; Vacinação contra infeções por Vírus do Papiloma Humano (HPV). **Direcção-Geral da Saúde**. (2008)

115 - VINCE, A.; LEPEJ, S.Z.; Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection. **Medisinsky Glasnik – Official Journal of the Medical Association of Zenica Dobo Canton**. 7:1. (2009), 18-25.

116 - WENTZENSEN, N.; GRAVITT, P.E.; SOLOMON, D.; WHEELER, C.M.; CASTLE, P.E.; A Study of Amplicor HPV DNA Detection in the ASCUS-LSIL Triage Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 18:5 (2009), 1341–1349.

117 - WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Screening group: Chapter 4: An introduction to colposcopy: indications for colposcopy, instrumentation, principles and documentation of results**. [em linha] France: IARC. [Consult. 25 Abr. 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=1&chap=4>

118 - WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Screening group: Cytopathology of the**

uterine cervix - digital atlas. [em linha] France: IARC. [Consult. 25 Abr. 2011]
Disponível em WWW:<URL: <http://screening.iarc.fr/atlascyto.php>

119 - WU, Q.J.; GUO, M.; LU, Z.M.; LI, T.; QIAO, H.Z.; KE, Y.; Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. **British Journal of Cancer**. 89 (2003), 672 – 675.

120 - XI, L.F.; KOUTSKY, L.A.; CASTLE, P.E.; EDELSTEIN, Z.R.; MEYERS, C.; HO, J.; SCHIFFMAN, M. Relationship between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 and 18 DNA load. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 18:12 (2009), 3490–3496.

121 - YOUENS, K.E.; HOSLER, G.A.; WASHINGTON, P.J.; JENEVEIN, E. P.; MURPHY, K.M.; Clinical Experience with the Cervista HPV HR Assay Correlation of Cytology and HPV Status from 56,501 Specimens. **The Journal of Molecular Diagnostics**. 13:2 (2011), 160-166.